



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Wagner Oliveira Brito

**Produção de anticorpos policlonais para a pesquisa de produção
de toxina diftérica por cepas de *Corynebacterium diphtheriae***

Rio de Janeiro
2016

Wagner Oliveira Brito

Produção de anticorpos policlonais para a pesquisa de produção de toxina diftérica por cepas de *Corynebacterium diphtheriae*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora : Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B862 Brito, Wagner Oliveira.
Produção de anticorpos policlonais para a pesquisa de produção de toxina diftérica por cepas de *Corynebacterium diphtheriae* / Wagner Oliveira Brito - 2016.
71f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi
Coorientador: Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. Difteria – Teses. 2. *Corynebacterium diphtheriae* - Teses. 3. Toxina Diftérica. 4. Anticorpos - Teses. 5. Imunofluorescência. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Hirata Júnior, Raphael. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 576.852.23

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Wagner Oliveira Brito

Produção de anticorpos policlonais para a pesquisa de produção de toxina diftérica por cepas de *Corynebacterium diphtheriae*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de março de 2016.

Coorientador : Prof. Dr Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Débora Leandro Rama Gomes
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por minha existência;

Ao meus pais, Maria Lucielma e Frederico Brito, por todo o amor, dedicação, incentivo e pelo apoio em todas as fases da minha vida;

Às minhas irmãs, Marília e Elayne Cristina pelo amor, carinho e incentivo para que eu pudesse concluir este trabalho;

À minha amiga, companheira e esposa Kely Vila Nova, pelo apoio, compreensão e incentivo;

À Prof. Dra Ana Luiza de Mattos Guaraldi, pela orientação, pelo apoio irrestrito diante de todas as dificuldades, amizade, carinho e ensinamentos, que foram determinantes para o meu crescimento acadêmico e pessoal;

Ao Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior, o meu maior e mais profundo agradecimento, pela orientação, amizade, incentivo e pela sua disposição em ajudar em todos os momentos além de generosamente, contribuir com seu vasto conhecimento;

À Coordenação da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela compreensão e colaboração, possibilitando tempo para a minha efetivação da carga horária do Programa de Mestrado;

Aos amigos do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica da UERJ: Yuri, Cassios, Cíntia, Igor, Priscila, Gabriela, Débora, Louisy, Vanilda;

Aos colegas técnicos do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ;

Ao Programa de Pós-graduação de Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense;

Ao CNPq, CAPES, PRONEX, FAPERJ e SR2-UERJ pelo auxílio financeiro fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

A persistência é o menor caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

BRITO, Wagner Oliveira. **Produção de anticorpos policlonais para a pesquisa de produção de toxina diftérica por cepas de *Corynebacterium diphtheriae***. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Apesar do sucesso dos protocolos de imunização em massa contra a difteria em diversos países, incluindo no Brasil, essa enfermidade ainda continua sendo uma doença com potencial infeccioso reemergente e de alta morbidade e mortalidade, que requer a utilização de antitoxina diftérica (produzida em cavalos) para o tratamento e diagnóstico da produção de toxina. Nesta investigação, anticorpos antitoxina diftérica foram produzidos em coelhos e, após o fracionamento, a preparação de imunoglobulinas foram testados em paralelo à antitoxina produzida em cavalos (SAD comercial). Coelhos (n=2) foram imunizados com toxina diftérica dimerizada (desprovida de atividade tóxica). A imunização experimental nos coelhos foi realizada com o consentimento do comitê de experimentação animal da UERJ (CEUA/033/2015). As cepas clínicas e de referência foram testadas para a confirmação das espécies e produção de toxina pelo PCR multiplex. A reatividade contra a toxina produzida pelas cepas foi realizada pelos métodos fenotípicos usuais (imunodifusão radial simples e teste de Elek modificado). A capacidade de neutralização de toxina foi avaliada através do teste de citotoxicidade para células VERO. A detecção de toxina na superfície de amostra produtora de toxina (ATCC 27012) e não produtora de toxina (ATCC 27010) foi avaliada após a biotinição da fração de Igs e por revelação com estreptavidina conjugada à fluoresceína. A antitoxina de cavalo (SAD) apresentou diversas linhas de precipitação que poderiam gerar confusão quando da leitura do ensaio, através do teste de Elek modificado e diversas cepas não toxinogênicas apresentaram resultados positivos através do ensaio de imunodifusão radial (IDR). Uma discordância de 80% foi observada nos resultados de IDR entre as amostras tox^- , e de 40% através dos testes de Elek quando o SAD comercial foi utilizado. Os resultados utilizando a fração de imunoglobulinas de coelho apresentaram resultados variáveis apenas para uma cepa tox^- (HC03). De modo geral, uma concordância de 90% foi obtida nos ensaios de Elek modificado utilizando anticorpos de coelho. A fração de anticorpos de coelho foi capaz de neutralizar a toxina na diluição 1:1200, quando comparado com 0.1 UI de SAD. O soro pré-imune de ambos os coelhos foram incapazes de neutralizar a toxina ou reagir através do teste de Elek. Os anticorpos biotinilados foram capazes de ligar à cepa tox^+ ATCC 27012 através do método de fluorescência. O antissoro de coelho comportou-se como um reagente com maior precisão para a identificação das cepas tox^+ de *C. diphtheriae*, com um bom título neutralizante. Os anticorpos biotinilados podem ser utilizados como métodos diagnósticos da toxinogenicidade de amostras de *C. diphtheriae*.

Palavras-chave: Difteria. Anticorpos de coelho antitoxina diftérica. SAD. Toxina diftérica. Imunofluorescência. *Corynebacterium diphtheriae*.

ABSTRACT

BRITO, Wagner Oliveira. **Production of polyclonal antibodies for toxin production diphtheria search for strains of *Corynebacterium diphtheriae***. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Despite the success of mass immunization in many countries, including in Brazil, diphtheria continues to be a potentially lethal resurgent infectious disease, which requires the use of diphtheria antitoxin (produced in horse) for treatment and diagnosis of toxin production. In this investigation the antiserum against diphtheria toxin was produced in rabbits and, after fractionation, immunoglobulin preparation was tested in parallel with horse antitoxin (SAD). Rabbits (n=2) were immunized with dimerized (non-toxic) diphtheria toxin. The experimental immunization was performed with consent of the University Experimental Animal Board (CEUA/033/2015). Clinical and reference strains were tested for the confirmation of species and toxin production by multiplex PCR. Reactivity against toxin produced by the strains was performed by phenotypic methods (Radial immunodiffusion and modified Elek tests). The capability of toxin neutralization was evaluated by VERO cell toxicity test. The detection of toxin in the surface of a toxin producer (ATCC 27012), and a non-toxin producer (ATCC 27010) strains was evaluated after biotinylation of Igs fraction, and revealed by fluorescence with streptavidin coupled to fluorescein. Horse antitoxin (SAD) presented many precipitation lines that can be misled to toxin precipitin under modified Elek test, and many non-toxigenic strains gave positive results under radial immunodiffusion reaction analysis. An 80% discordance of toxin production result was observed by RID test amongst *tox*⁻ strains, and 40% by Elek test, using SAD. The results with rabbit antibody fraction presented variable results for only one *tox*⁻ strain (HC03). In general, a concordance of 90% was obtained by Elek test using rabbit antibody. The rabbit antibody fraction was capable to neutralize the toxin in a dilution of 1:1200 correlated to 0,1 IU of SAD. Preimmune sera of both rabbits were incapable to neutralize or react by Elek test. Biotinylated antibodies were capable to bind the *tox*⁺ ATCC 27012 strain, by fluorescence method. The rabbit antiserum rendered a more accurate reagent to identify *tox*⁺ *C. diphtheriae* strains, with a good neutralization titer. Biotinylated antibodies can be used for diagnosis of toxigenic *C. diphtheriae* strains.

Keywords: Diphtheria. rabbit antibodies diphtheria antitoxin. SAD. Diphtheria Toxin. Immunofluorescence. *Corynebacterium diphtheriae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Principais manifestações visíveis da difteria.....	15
Figura 2 –	Estrutura cristalográfica da molécula de toxina diftérica.....	16
Figura 3 –	Cobertura mundial de imunização com vacina DTP3 em crianças, 2014.....	26
Figura 4 –	PCR multiplex para confirmação de espécie bacteriano e potencial toxinogênico.....	35
Figura 5 –	Imunodifusão radial (IDR).....	39
Figura 6 –	Elek-modificado.....	41
Figura 7 –	Confirmação das amostras por PCR multiplex.....	47
Tabela 1 –	Avaliação do efeito citotóxico em cultura de células Vero de amostras de <i>C. diphtheriae</i>	52
Figura 8 –	Imunofluorescência de <i>C. diphtheriae</i> ATCC-27010 (atoxinogênica) tratada com anticorpo anti-TD biotinilado de coelho e estreptavidina-FITC na diluição 1:80.....	55
Figura 9 –	Imunofluorescência de <i>C. diphtheriae</i> ATCC-27012 (toxinogênica) tratada com anticorpo anti-TD biotinilado de coelho e estreptavidina-FITC na diluição 1:320.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Casos de difteria notificados por ano e cobertura vacinal.....	21
Gráfico 2 –	Viabilidade de células Vero frente a toxina diftérica padrão e neutralização do efeito citopático com a utilização de soro anti-toxina diftérico (SAD) a 0,1 e 1UI.....	53
Gráfico 3 –	Soroneutralização e titulação do soro anti-TD de coelho.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Características das 10 amostras de <i>C. diphtheriae</i> estudadas.....	33
Quadro 2 –	Principais características do modelo animal.....	36
Quadro 3 –	Pesquisa dos genes <i>dtxR</i> e dos fragmentos das porções <i>A</i> e <i>B</i> do gene <i>tox</i> , pela técnica de PCR multiplex em amostras de <i>C. diphtheriae</i>	48
Quadro 4 –	Resultados de IDR e Elek-modificado com SAD em cepas padrões e amostras clínicas de <i>C. diphtheriae</i>	50
Quadro 5 -	Comparação dos resultados das técnicas de mPCR; IDR e Elek-modificado com SAD; e Elek-modificado com soro anti-TD de coelho.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADPR	ribose adenosina difosfato
ADP	adenosina difosfato
ADPR	adenosina ribose difosfato
Anti-TD	antitoxina diftérica
ATCC	“American Type Cell Culture”
CDC	Centers for Disease Control and Prevention-USA
D.O.	densidade óptica
DAPI	4´6´-Diamino-2- Fenil Indol
DMEM	Meio essencial modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
dT	vacina dupla para adultos (difteria e tétano)
DTP3	vacina tríplice (difteria, coqueluxe e tétano)
<i>dtxR</i>	regulador da expressão de toxina diftérica
Dnase	enzima que quebra a cadeia de DNA
EC ₅₀	efeito citopático para 50% da população de células
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EF- 2	fator de alongamento de cadeia peptídica 2
EV -	Endovenosa
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FITIC	fluoresceína-5-isotiocianato
HB-EGF	fator de crescimento epidérmico ligante de heparina
HC	hemocultura
Hep-2	células epiteliais humanas originadas de carcinoma de laringe
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B
ICS	Imunocromatografia
IDR	teste de imunodifusão radial simples
Igs	imunoglobulinas
IgG-	imunoglobulina G
IM	Intramuscular

MEM	meio mínimo essencial
MO	microscopia óptica
MTT	brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazólio
NAD	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
PBS	solução salina tamponada com solução de Sorensen
PBS-D	PBS modificado por Dulbecco
PCR	reação em cadeia da polimerase
PW-8	Park WILLIAMS N°8
SAD	soro antidiftérico
SFB	soro fetal bovino
TD	toxina diftérica
TD-A	fragmento A da toxina diftérica
TD-B	fragmento B da toxina diftérica
<i>tox</i> -	gene tox
TSA	“Trypticase Soy Agar”
TSB	“Trypticase Soy Broth”
Vero	células de linhagem contínua de rins de macaco verde africano

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	32
1.1	Geral	32
1.2	Específicos	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1	Origem e manutenção das amostras bacterianas	33
2.2	Confirmação da espécie e da presença do gene <i>tox</i> por mPCR	34
2.2.1	<u>Ensaio de pcr multiplex (mPCR)</u>	34
2.3	Experimentos de imunização de modelo animal com toxina diftérica	35
2.3.1	<u>Considerações éticas</u>	35
2.3.2	<u>Modelo animal</u>	35
2.3.2.1	Manutenção dos coelhos.....	36
2.3.3	<u>Produção de IgG antitoxóide diftérico</u>	37
2.3.3.1	Aquisição de soro pré-imune.....	37
2.3.3.2	Imunização.....	37
2.4	Pesquisa da produção de toxina diftérica empregando imunoensaios	38
2.4.1	<u>Técnica de imunodifusão radial simples (IDR)</u>	38
2.4.2	<u>Elek modificado</u>	39
2.5	Ensaio de citotoxicidade com células Vero	41
2.5.1	<u>Linhagem celular, manutenção e controle de qualidade das células</u>	41
2.5.2	<u>Pesquisa de citotoxicidade e neutralização em células eucarióticas de linhagem Vero</u>	42
2.5.2.1	Obtenção e preparação das amostras bacterianas.....	42
2.5.2.2	Execução do teste.....	43
2.5.2.3	Avaliação qualitativa e quantitativa dos resultados.....	43
2.5.2.4	Neutralização do efeito citotóxico.....	44
2.6	Precipitação, purificação e biotinição de anticorpo específico anti-TD de coelho	44

2.6.1	<u>Precipitação e purificação parcial dos anticorpos da fração gamaglobulina presentes no soro imune com sulfato de amônio.....</u>	44
2.6.2	<u>Biotinilação.....</u>	45
2.7	Pesquisa da expressão de TD na superfície bacteriana por ensaios de imunofluorescência usando o anticorpo biotilado.....	45
2.7.1	<u>Reação da imunofluorescência indireta (IFI) para detecção da expressão de TD em superfície bacteriana.....</u>	45
2.8	Análise estatística.....	46
3	RESULTADOS.....	47
3.1	Confirmação das amostras bacterianas.....	47
3.1.1	<u>PCR multiplex.....</u>	47
3.2	Confirmação de toxigenicidade das cepas por imunoenaios	48
3.2.1	<u>Ensaio de IDR e Elek-modificado com SAD.....</u>	49
3.2.2	<u>Ensaio de IDR e Elek-modificado com Soro de Coelho.....</u>	50
3.2.3	<u>Teste de toxigenicidade em células Vero de linhagem contínua.....</u>	51
3.2.4	<u>Soroneutralização com SAD.....</u>	52
3.2.5	<u>Soroneutralização com o soro de coelho.....</u>	53
3.3	Imunofluorescência indireta.....	54
4	DISCUSSÃO.....	57
	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

INTRODUÇÃO

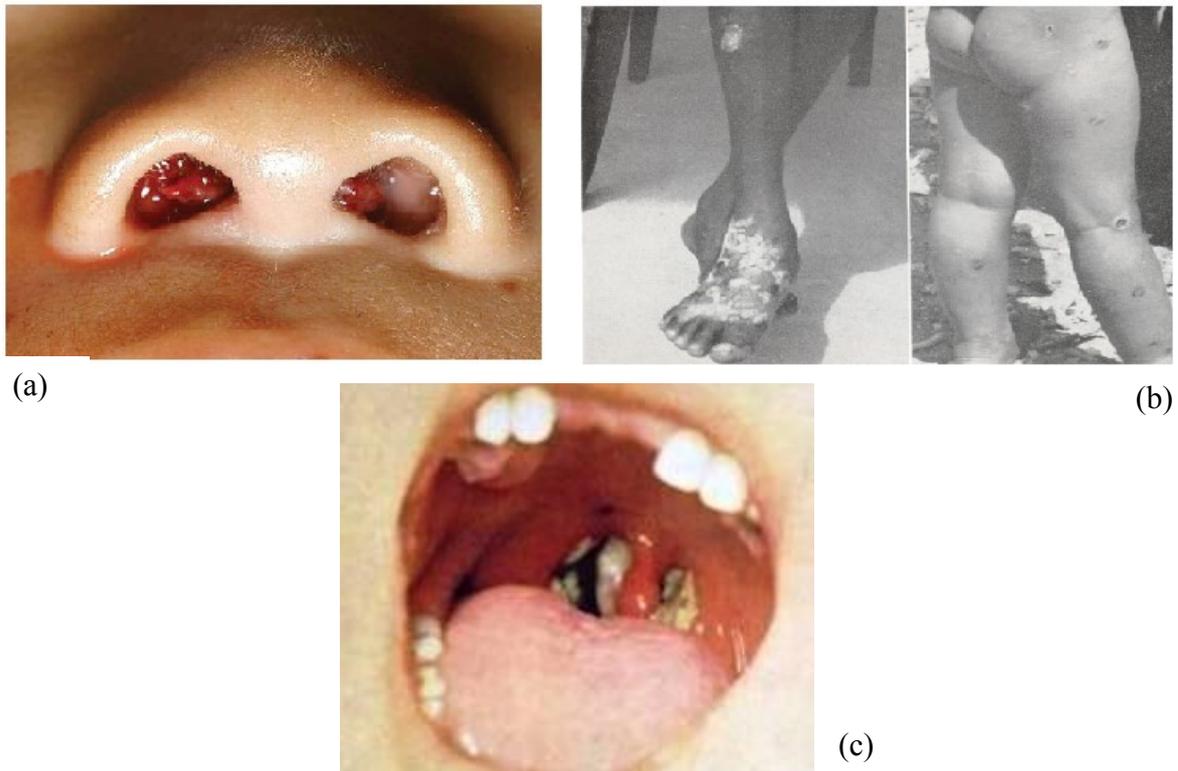
Difteria e toxina diftérica

A difteria é uma doença de etiologia bacteriana, causada pelo *Corynebacterium diphtheriae* e de evolução aguda, cujos efeitos locais e sistêmicos estão relacionados à produção de uma exotoxina. Apesar de ser responsável por epidemias e surtos epidêmicos em vários continentes (GALAZKA, 2000; POPOVIC et al., 2000; MATTOS-GUARALDI et al., 2003), outras espécies do gênero, incluindo *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* também são capazes de produzir a toxina diftérica (DIAS et al., 2011; TORRES et al., 2013).

Após a colonização em trato respiratório superior (faringe, tonsila e cavidade nasal), o patógeno multiplica-se causando faringo-tonsilite, com a formação de uma pseudomembrana branco acinzentada, com proliferação vascular na região da submucosa. Os primeiros sinais/sintomas da doença são relativamente inespecíficos, caracterizados por mal-estar geral, apatia, febre baixa (37,5 a 38,5°C), dor de garganta e inapetência. Com a evolução da doença, a formação de pseudomembrana branco-acinzentada afeta, sobretudo as regiões de tonsila, oro e nasofaringe (**Figura 1**). Nos casos de maior gravidade, pode estender-se por todo o trato respiratório inferior, ocasionando quadro de insuficiência respiratória aguda por obstrução alta (MACAMBIRA, FORMIGA & FORMIGA, 1994; SALYERS & WHITT, 1994; HADFIELD et al., 2000; KADIROVA, KARTOGLU & STREBEL, 2000, GUARALDI & HIRATA, 2016). Apesar da indução do quadro clínico, o microrganismo é caracterizado classicamente como não invasor, visto que normalmente não é isolado do sangue de indivíduos acometidos pela difteria (SALYERS & WHITT, 1994; BEAVIS & WEYMOUTH, 1996).

Ao multiplicar-se na porta de entrada, as cepas toxinogênicas produzem uma toxina de natureza proteica que apresenta tropismo pelo miocárdio, rins e supra-renais (BASEMAN et al., 1970; MACAMBIRA, FORMIGA & FORMIGA, 1994; BEAVIS & WEYMOUTH, 1996; GUARALDI & HIRATA, 2016). Na maioria dos pacientes com difteria, as evidências de miocardite podem ser detectadas tipicamente entre 1 a 2 semanas após aparecer sinais de melhora da faringite. Os sintomas podem se apre-

Figura 1- Principais manifestações visíveis da difteria



Legenda: (a) – difteria nasal ; (b) – difteria cutânea; (c) - .Pseudomenbrana
 Fonte: adaptado de MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; GUARALDI & HIRATA, 2016.

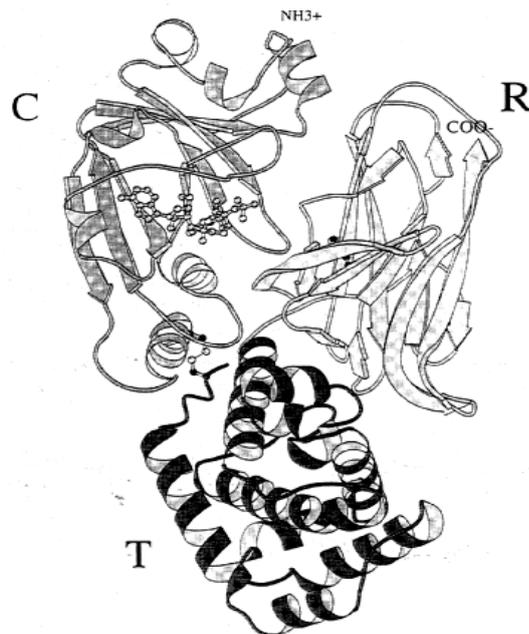
sentar gradualmente ou de forma aguda, progredindo para um quadro de doença grave que pode culminar em deficiência cardíaca, arritmias e morte. A neurotoxicidade é proporcional à gravidade da doença primária e é influenciada pela imunidade do paciente, podendo desenvolver neuropatia, inicialmente localizada no palato mole e faringe, e mais tarde, envolvendo o oculomotor e causando paralisia ciliar com progressão para neurite periférica (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; MATTOS-GUARARALDI, HIRATA Jr. & DAMASCO, 2011).

A pele é considerada um reservatório de importância na circulação do *C. diphtheriae*, podendo o microrganismo ser isolado de vários tipos de lesões cutâneas, incluindo picadas de insetos e traumatismos. Admite-se que as infecções cutâneas sejam mais contagiosas do que os perdigotos oriundos do trato respiratório (MACAMBIRA, FORMIGA & FORMIGA, 1994; QUICK et al., 2000; GUARALDI & HIRATA, 2016). O microrganismo coloniza a pele e invade o tecido subcutâneo através de fissuras ou feridas prévias formando uma pápula e que posteriormente evolui para uma úlcera crônica que não cicatriza. Cepas de *Staphylococcus aureus*

ou *Streptococcus pyogenes* também podem ser frequentemente encontrados nestas feridas. (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009).

A toxina diftérica (TD) é um peptídeo de aproximadamente 58 kDa, consistindo de 535 aminoácidos (PAPPENHEIMER, 1977; SMITH et al., 1980; COLLIER, 2001). A molécula contém quatro resíduos de cisteína e duas pontes dissulfeto internas. O tratamento com agentes redutores de pontes dissulfeto gera o fragmento A (TD-A) livre (aminoácidos 1 a 193), que corresponde ao domínio catalítico e o fragmento B (TD-B) (aminoácidos 194 a 535), o qual corresponde aos domínios de translocação e ligação ao receptor da TD. A toxina diftérica exibe três regiões distintas: o domínio C, amino-terminal, responsável pela ADP-ribosilação do fator de alongamento de cadeia (EF-2); o domínio T, localizado centralmente, responsável pela inserção na membrana em pH ácido, formação de canais e translocação do domínio C pelas membranas endossomais para liberação no citosol; e o domínio R, carboxi-terminal, responsável pela ligação da TD ao precursor do fator de crescimento epidérmico ligante de heparina (HB-EGF) que funciona como um receptor para TD nas células susceptíveis (**Figura 2**) (PAPPENHEIMER, 1977; GREENFIELD et al., 1983; ZUCKER, MURPHY & PAPPENHEIMER, 1984; OLSON, 1993; ROLF & EIDELS, 1993; COLLIER, 2001).

Figura 2 - Estrutura cristalográfica da molécula de toxina diftérica



Legenda: . C. domínio C amino-terminal. T. domínio T. R. domínio R carboxi-terminal.
Fonte: COLLIER, 2001.

A interação da TD com o precursor HB-EGF favorece a endocitose com participação de clatrin. Posteriormente, os complexos TD-receptor sofrem degradação lisossomal e as moléculas que escapam da ação enzimática tornam-se as principais responsáveis pelo processo de intoxicação celular por ribosilação do fator de alongamento 2 (MORRIS et al., 1985; LEMICHEZ et al., 1997). Condições ácidas (DRAPER & SIMON, 1980; SANDVIG & OLSNES, 1980), que induzem mudança conformacional da TD, permitem sua inserção na membrana e formação de canal pelo qual ocorre a translocação do fragmento A (MOSKAUG, SANDVIG & OLSNES, 1988).

A toxina diftérica é uma pró-enzima que atua cataliticamente transferindo um monômero de ribose adenosina difosfatado (ADPR) do NAD para o EF-2, inibindo, assim, o alongamento de cadeias polipeptídicas durante a síntese proteica celular de células eucarióticas suscetíveis. Uma única molécula de TD-A, introduzida diretamente no citoplasma, é suficiente para matar a célula eucariótica (YAMAIZUMI et al., 1978).

A TD é uma toxina bacteriana extremamente potente, com uma dose letal mínima de 50-100 ng/kg de peso corporal (PAPPENHEIMER, 1977; MEKADA, OKADA & UCHIDA, 1988; PAPPENHEIMER, 1993).

A inibição da síntese proteica parece não ser a única atividade biológica da toxina diftérica (CHANG et al., 1989a). Foi demonstrado que a toxina possui atividade de clivagem internucleossomal de DNA atribuída ao fragmento A (CHANG et al., 1989b; NAKAMURA & WISNIESKI, 1990). O processo de degradação cromossomal precede a citólise e não parece ser uma simples consequência da inibição da síntese proteica. Entretanto, a proposição de uma segunda via de morte celular é ainda bastante discutida na literatura e permanece por ser definida (GROMAN & DEAN, 1973; BODLEY, 1990; JOHNSON, 1990; WILSON et al., 1990; LESSNICK et al., 1990).

A produção de toxina diftérica por cepas toxinogênicas de *C. diphtheriae* é diretamente afetada pela composição do meio de cultura e pelas condições de cultivo. A transcrição do gene *tox* é negativamente regulada por íons de ferro e uma proteína repressora, DtxR (diphtheria toxin repressor), que atua sobre a região promotora do gene da toxina diftérica. Esta proteína ligante de DNA (DNA-binding protein), dependente de ferro, tem grande destaque, pois atua como um regulador global do metabolismo do *C. diphtheriae* (SCHMITT, 1997; SCHMITT, TALLEY &

HOLMES, 1997).

As culturas de *C. diphtheriae* podem ser infectadas por vários tipos de bacteriófagos. Foi demonstrado que o contato de cepas atoxinogênicas de *C. diphtheriae* com bacteriófagos oriundos de cepas toxinogênicas transformou essas culturas em toxinogênicas, evidenciando que a conversão para a toxinogenicidade era fago-induzida (FREEMAN, 1951; GROMAN, 1953; GROMAN, 1956). Alguns autores sugeriram que o bacteriófago β continha o gene responsável pela produção de toxina (GROMAN & EATON, 1955). Evidências posteriores demonstraram a presença do gene da toxina (*tox*) no genoma do bacteriófago (UCHIDA, GILL & PAPPENHEIMER, 1971).

Estudos, abordando o fenômeno da conversão fágica, têm verificado que cepas de *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* infectadas por vários tipos de bacteriófagos *tox+* também podem evoluir para a toxinogenicidade, demonstrando, dessa forma, o potencial indicador desses tipos bacterianos para a produção de bacteriófagos *tox*. (GROMAN, 1984). A integração do genoma de alguns bacteriófagos *tox+*, isolados de amostras de *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, acontece em uma mesma seqüência nucleotídica presente no genoma do *C. diphtheriae* (BUCK et al., 1985).

Agentes etiológicos potencialmente produtores de toxina diftérica

As espécies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, podem carrear o gene *tox* que codifica a toxina diftérica. *C. diphtheriae* é o principal agente etiológico da difteria, mas atualmente, *C. ulcerans* também vem sendo isolado dos quadros de difteria, enquanto as infecções causadas por *C. pseudotuberculosis* em humanos, ocorrem na forma de linfadenite, linfangite ulcerativa e abscessos, sendo o quadro de difteria raramente observado. (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; EFSTRATIOU et al., 1998; FUNKE & BERNARD, 2007). As espécies são caracterizadas como bastonetes Gram positivos, pleomórficos, aeróbios, desprovidos de mobilidade, não esporulados, podendo ser toxinogênicos (produtora da TD) ou atoxinogênicos. *C. diphtheriae* foi classificado em quatro subespécies: *gravis*, *mitis*, *intermedius* e *belfanti*. Tal subdivisão, foi baseada na morfologia

colonial em meio de cultivo ágar-chocolate-telurito (ACT), no padrão bioquímico de fermentação de carboidratos e no potencial de hemólise das amostras. A subespécie *gravis* é capaz de fermentar o amido e o glicogênio, enquanto que a subespécie *belfanti* se diferencia pela incapacidade de redução do nitrato (EFSTRATIOU et al., 1998; FUNKE & BERNARD, 2007). Atualmente, a maioria das infecções tem ocorrido pelas subespécies *mitis* e *gravis* (GUARALDI & HIRATA, 2016). Além dos quadros de difteria, *C. diphtheriae* não produtores de toxina vem sendo isolado com frequência de quadros de endocardite infecciosa, osteomielite e lesões ulcerativas em pacientes com câncer. Tais aspectos vêm chamando atenção para outros fatores de virulência de *C. diphtheriae*, além da toxina diftérica (MATTOS-GUARARALDI, HIRATA Jr. & DAMASCO, 2011).

C. ulcerans vêm sendo um dos agentes mais importantes associados à difteria em populações humanas na Europa e na América do Norte. Por ser usualmente isolado de animais, *C. ulcerans* tem sido transmitido através de fômites oriundo de animais de estimação. Animais tais como cães são capazes de albergar *C. ulcerans* no trato respiratório no Brasil e no exterior (DIAS et al., 2011), especialmente no Japão. Devido ao fato de poder colonizar diversas espécies animais, *C. ulcerans* tem sido pesquisado em várias espécies, tendo sido isolado de infecção sistêmica em *Orcinus orca* (Orca) de um aquário marinho no Japão (YUKIJI et al., 2008).

C. pseudotuberculosis é uma espécie isolada prevalentemente de gados equinos, ovinos, caprinos, bovinos e bubalinos (ALEMAN et al., 1996; PEEL et al., 1997; COSTA et al., 1998; SELIM, 2001). Entretanto, pode ser isolada de outras espécies tais como lhamas e camelos. De forma geral, o processo infeccioso que esta espécie causa é principalmente linfadenite caseosa, quadro mais comumente observado em seres humanos, quando raramente infectados por esta espécie (PEEL et al., 1997).

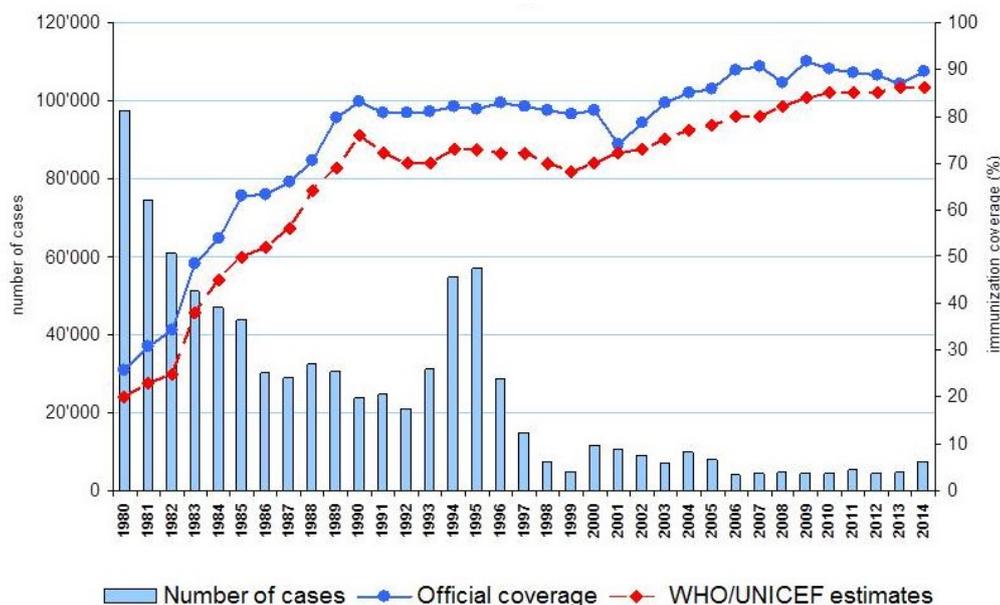
Aspectos epidemiológicos: a difteria no mundo e no Brasil

A difteria é considerada uma doença do velho mundo e apesar dos eficientes programas de vacinação da população, na maioria dos países, ainda permanece como uma doença que compromete a população sendo causa de morbidade e mortalidade em diversos países. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), estima-se que em 2002 ocorreram 5.000 mortes no mundo causadas por difteria, sendo que 4.000 foram em crianças menores de 5 anos (GUARALDI & HIRATA, 2016). Atualmente, conforme último levantamento (WHO, 2015a), foram reportados 7.324 casos de difteria em todo o mundo. A maioria dos casos concentrou-se na região sudeste da Ásia com 6.094 ocorrências na Índia (\cong 83.2%) e 1.079 no Nepal (\cong 14,73%), mesmo com imunização em torno de 80 a 91% da população. A aglomeração de pessoas e a higiene pessoal deficiente, são fatores que favorecem a transmissão da doença nesses países. Em países industrializados como os Estados Unidos e Canadá que possuem um dos melhores programas de imunização infantil, também houveram ocorrências de difteria no ano de 2014 com um caso em cada país.

Analisando o **Gráfico 1**, que apresenta a distribuição de casos reportados de difteria no mundo e cobertura vacinal no período de 1980 a 2014, nota-se a partir do ano de 1981, um decaimento no número casos de difteria à medida que aumenta-se a imunização da população no decorrer do tempo, exceto, nos anos de 1993 a 1995, onde percebe-se um crescimento no número de quadros de difteria mesmo com as altas taxas de imunização.

Apesar de pouco notificada no Brasil, a difteria ainda permanece endêmica, causando surtos epidêmicos em diversas regiões. A última delas ocorreu no período de 2010 a 2011 no estado do Maranhão. Na época, foram 27 casos confirmados, onde foram observadas crianças parcialmente ($n=16$) e totalmente imunizadas ($n=10$). Do total, três foram a óbito, destes, duas eram crianças que tinham o esquema de vacinação totalmente completo (SANTOS et al., 2014).

Grafico 1 - Casos de difteria notificados por ano e cobertura vacinal



Source: WHO/IVB database, 2015
194 WHO Member States.
Data as of July 2015

Date of slide: 14 July 2015



Fonte: WHO, 2015a.

Nos últimos dez anos foram reportados 170 casos de difteria no Brasil, onde o maior número de ocorrências aconteceram nos anos de 2008 e 2010 com 85 e 32 casos, respectivamente. Em 2014, foram reportadas 4 ocorrências (WHO, 2015b).

Tratamento e prevenção

O prognóstico da difteria depende do nível de imunidade do paciente, além da precocidade do diagnóstico e do tratamento. Amostras de soro do paciente devem ser obtidas antes da administração de soro antidiftérico (SAD), visando a dosagem de anticorpos antitoxina diftérica. A demonstração de níveis não protetores ($\leq 0,01$ UI/ml) de anticorpos pode auxiliar no diagnóstico de casos quando as culturas são negativas. Um dos testes realizados para o diagnóstico da toxigenicidade das cepas é o teste de Elek, que consiste na imunoprecipitação da toxina diftérica produzida pelo microrganismo produtor. Além da demonstração fenotípica da

produção de TD, ensaios de PCR também são realizados para determinar a presença do gene (*tox*) na amostra de DNA obtida do microrganismo.

No tratamento da difteria, o SAD deve ser administrado imediatamente para a neutralização da toxina diftérica antes da internalização da mesma nas células alvo hospedeiras, pois, uma vez internalizada, a morte celular torna-se inexorável. Entretanto, como o SAD é produzido em cavalos, são necessários outros cuidados para evitar as reações de hipersensibilidade do tipo III (por complexos imune). A quantidade de SAD a ser administrada deve ser baseada na gravidade da infecção. Nos casos graves, usualmente, recomenda-se de 80.000 a 120.000 U. Em casos leves e moderados, é normalmente aceita como suficiente uma dosagem de 20.000 a 40.000 U e 40.000 a 80.000 U, respectivamente. Nos casos leves e moderados, pode-se administrar metade da dose por via intramuscular (IM) e a outra metade por via endovenosa (EV) e nos casos mais graves, dois terços EV e o restante IM (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; BIO-MANGUINHOS, 2016).

O primeiro soro terapêutico eficaz contra a difteria, foi desenvolvido em 1890 pelo médico alemão Emil Adolf von Behring e seu colega Erich Wernicke, fato que lhe proporcionou o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1901 (NOBELPREIS, 2016). Os anticorpos utilizados nos procedimentos de imunidade passiva contra a TD são proteínas circulantes produzidas em resposta à exposição aos antígenos. Em geral, os anticorpos apresentam diversidade e especificidade quanto a sua capacidade de detectar, localizar, reconhecer, ligar-se e inativar ou dar início ao processo de eliminação de um antígeno, sendo os mediadores primários da imunidade humoral contra todas as classes de microrganismos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

As moléculas de anticorpos/imunoglobulinas compartilham características comuns básicas, apresentando variabilidade na região de ligação aos antígenos, o que lhes permitem ligar-se especificamente ao seu antígeno correspondente. A molécula de imunoglobulina apresenta estrutura simétrica, composta por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas compostas por regiões aminoterminais variáveis (V), que participam do reconhecimento de antígenos, e regiões carboxiterminais constantes (C), estas por sua vez, medeiam as funções efetoras das moléculas de anticorpo (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

Os anticorpos produzidos no soro de vertebrados, ou seja, adquiridos após sucessivas imunizações de animais e coleta do soro hiperimune, são originados de

vários clones de células B, o que proporciona uma mistura de diferentes imunoglobulinas podendo cada um responder a diferentes epítomos de um antígeno, sendo caracterizados como anticorpos policlonais (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

Imunoensaios são métodos laboratoriais analíticos que utilizam a especificidade dos anticorpos para a mensuração da resposta aos diferentes antígenos. Todos os imunoensaios são caracterizados por uma reação de ligação entre o analito-alvo e um anticorpo (MOURA, 2010). Os anticorpos utilizados nos imunoensaios podem ser policlonais ou monoclonais. De acordo com a metodologia e características de produção, os anticorpos policlonais são facilmente gerados, e reagem com vários epítomos do imunógeno, porém são limitados ao volume de soro coletado, e quando não purificados podem gerar reações inespecíficas. Já os monoclonais, são mais demorados para serem adquiridos e dispendiosos por serem originados a partir do cultivo *in vitro* de hibridoma, entretanto, uma vez gerados podem ser mantidos de forma contínua (KURSTAK, 1986, LIPMAN et al. 2005, LEENAARS, 2005). Assim é de extrema importância a produção de anticorpos contra os antígenos contra os quais pretendemos determinar a imunorreatividade ou o desenvolvimento de diversos testes para diagnóstico microbiológico, em especial para os ensaios para a determinação da produção de TD por cepas toxinogênicas de bacilo diftérico.

Para eliminação do bacilo diftérico, faz-se uso dos antibióticos eritromicina ou penicilina (antibioticoterapia) evitando a proliferação do microrganismo e conseqüentemente a produção de toxina. Para o controle da disseminação da doença, os portadores assintomáticos de *C. diphtheriae* na nasofaringe ou na pele devem ser submetidos à antibioticoterapia, independentemente da sua situação vacinal. Apesar de a eritromicina ser mais eficaz na eliminação do estado de portador, por motivos operacionais (e também porque apresenta uma boa eficácia), a penicilina benzatina também pode ser administrada, via IM, em dose única de 600.000 UI para os menores de 30 kg e 1.200.000 UI para os maiores de 30 kg (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; MATTOS-GUARARALDI, HIRATA Jr. & DAMASCO, 2011).

A imunidade contra a difteria é obtida através de vacinação com o toxoide diftérico, sendo que o protocolo de imunização é direcionado à toxina e não contra outras moléculas de superfície microbiana. Sendo assim, indivíduos imunes à toxina

podem ser portadores do microrganismo. O risco de infecção é semelhante, tanto para a pessoa vacinada como para a não vacinada, mas o risco de desenvolver a doença é maior para os indivíduos não vacinados ou submetidos a um esquema de vacinação incompleto. A doença normalmente não confere imunidade permanente, devendo o convalescente reiniciar seu esquema de vacinação após a alta hospitalar. A imunidade também pode ser adquirida naturalmente através de infecções inaparentes e/ou atípicas ou pela passagem de anticorpos maternos via transplacentária, que persistem até o segundo mês de vida do recém-nascido (MATTOS-GUARARALDI, HIRATA Jr. & DAMASCO, 2011).

A vacina contra difteria é preparada a partir da toxina purificada, oriunda da amostra padrão Park-Williams (PW-8), e tratada com formalina e calor para destruir sua atividade tóxica tornando-se inativada mas retendo sua imunogenicidade o suficiente para fornecer proteção contra a doença. Os toxóides da difteria e do tétano (dT) são combinados em uma única vacina com uma preparação morta da bactéria *Bordetella pertussis*, denominada tríplice bacteriana (DTP). A resposta imune ao toxoide diftérico é reforçada pelo efeito adjuvante das bactérias da coqueluche, que produzem uma forte reação inflamatória no local da injeção (BIO-MANGUINGOS, 2016).

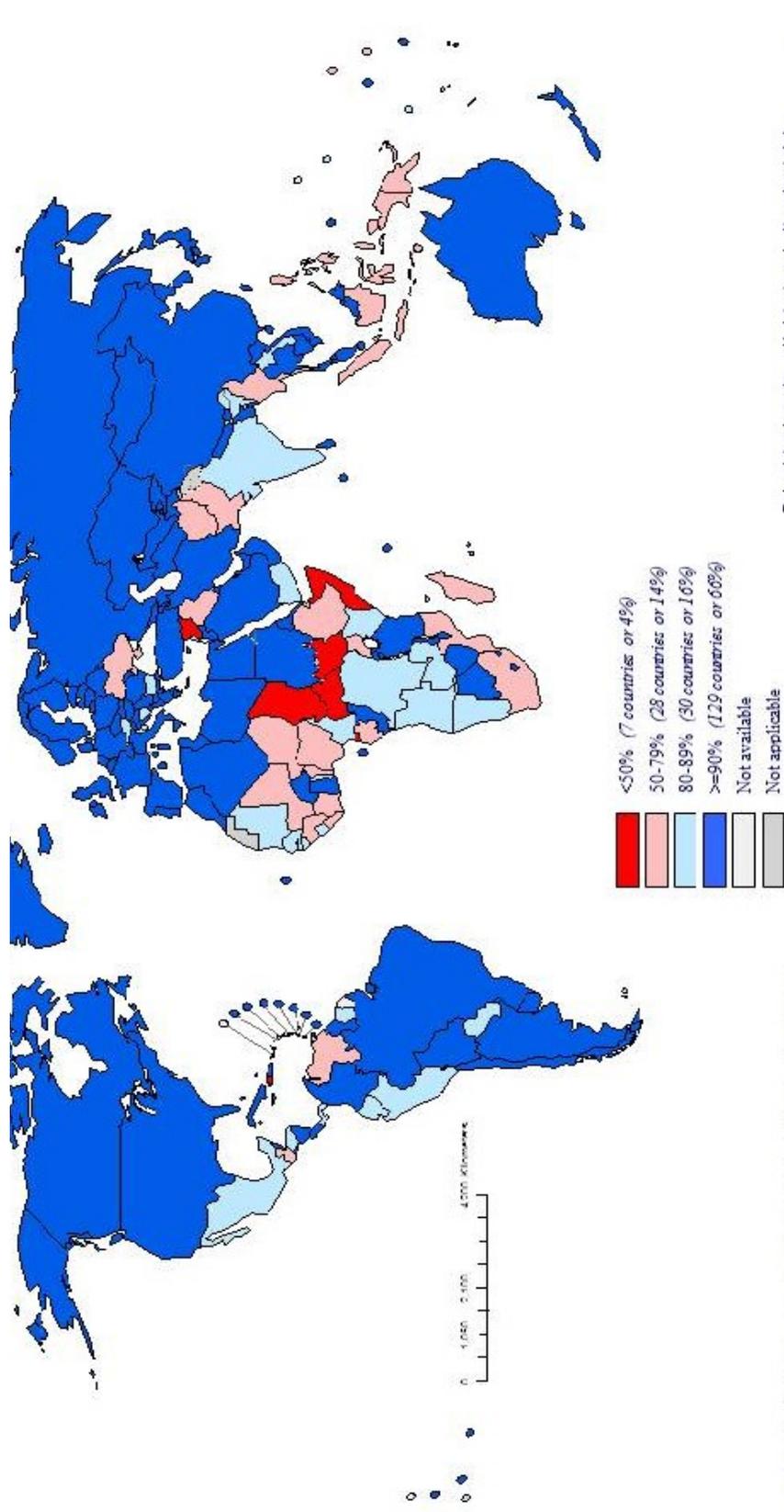
A vacina triplice (DTP3) é composta com vacina contra difteria, tétano e coqueluche sob a forma de suspensão injetável. A vacina combinada Tetravalente (DTP + Hib) consiste de duas vacinas: a polissacarídica contra *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) conjugada com o toxoide tetânico liofilizado. É indicada para crianças entre dois meses e um ano de idade. A vacina dupla contém os toxoides diftérico e tetânico e é apresentada nas formas infantil (DT) e adulto (dT). A vacina DT contém a mesma quantidade de toxoides tetânico (10 a 20 UI) e diftérico (30 UI) que a vacina tríplice (DTP3). Já a dT contém menor quantidade de toxoide diftérico (2 a 4 UI) (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; BIO-MANGUINGOS, 2016).

Atualmente, o esquema de vacinação infantil é feito aos 2, 4 e 6 meses de idade com a vacina Tetravalente e dois reforços com a Tríplice Bacteriana (DTP3). O primeiro reforço aos 15 meses e o segundo entre 4 e 6 anos. Adolescentes (de 11 a 19 anos) que já receberam anteriormente 3 (três) doses ou mais das vacinas DTP, DT ou dT, aplicar uma dose de reforço. O intervalo mínimo entre as doses é de 30 dias. São necessárias doses de reforço da vacina a cada 10 anos. A partir dos 20 (vinte) anos, gestantes, não gestantes, homens e idosos que não tiverem

comprovação de vacinação anterior, devem seguir o esquema de 3 doses; apresentando carteira de vacinação com esquema incompleto, completar o esquema já iniciado. Adolescentes ou mulheres grávidas que estejam com a vacina em dia, mas receberam a última dose há mais de 05 (cinco) anos, precisam receber uma dose de reforço. Em caso de ferimentos graves em adolescentes ou adultos, a dose de reforço deverá ser antecipada para cinco anos após a última dose. (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009; BIO-MANGUINGOS, 2016).

Na **Figura 3**, estão demonstrados a cobertura vacinal em crianças no ano de 2014 no mundo.

Figura 3 - Cobertura mundial de imunização com vacina DTP3 em crianças, 2014



Source: WHO/UNICEF coverage estimates 2014 revision, July 2015. Map production: Immunization Vaccines and Biologicals, (IVB), World Health Organization
 Date of slide: 16 July 2015

The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there is no agreement. © WHO 2015. All rights reserved.

Fonte: WHO, 2015a.

Fatores de virulência de *C. diphtheriae*

As manifestações locais e sistêmicas da difteria têm sido principalmente relacionadas à ação da exotoxina diftérica (TD), que é o fator de virulência mais bem estudado de *C. diphtheriae* e outras espécies toxinogênicas do gênero *Corynebacterium*.

A capacidade de produzir doenças invasivas adiciona um novo aspecto ao potencial de patogenicidade de *C. diphtheriae*. Cepas toxigênicas e não-toxigênicas de *C. diphtheriae* são capazes de causar doenças invasivas em humanos. Em algumas situações, infecções sistêmicas como endocardite, sepse, osteomielite, artrite, abscesso esplênico e pneumonia, além de infecções relacionadas ao uso de catéteres, podem ser causadas por cepas não produtoras de toxina diftérica. Dentre estas, a endocardite é a manifestação clínica mais frequente e responsável por um elevado índice de mortalidade (15-50%), inclusive de indivíduos previamente imunizados. A presença de fatores de risco não tem sido necessária para o desenvolvimento de endocardite tanto em adultos quanto em crianças. De acordo com alguns autores, a ocorrência de endocardite por *C. diphtheriae* talvez seja mais comum do que se supõe. Interessante e pouco estudado é o fato de ocorrer melhora do quadro clínico de endocardite quando administrado aos pacientes o soro anti-toxina diftérica (SAD) produzido em cavalos. Atualmente, a natureza multifatorial da virulência de *C. diphtheriae* tem sido mais amplamente investigada (MATTOS-GUARARALDI, HIRATA Jr. & DAMASCO, 2011). Diversas amostras de *C. diphtheriae* isoladas no território nacional foram investigadas através do sequenciamento (TROST et al., 2012) em estudo relacionado ao pangenoma desta espécie. Ao longo dos últimos 20 anos foi observado que cepas de *C. diphtheriae* são capazes de aderir a substratos diferentes (vidro, plástico, eritrócitos e células HEp-2), invadir células eucarióticas, causar efeitos nocivos sobre nematódeos (*Caenorhabditis elegans*), causar infecções relacionadas à formação de biofilmes, formar biofilmes em superfícies plásticas e vítreas, aderir a proteínas de matriz extracelular (colágeno tipo I, fibronectina e fibrinogênio). Tais características de virulência são mais bem observadas com respeito ao *C. diphtheriae* do que para as outras espécies potencialmente toxinogênicas, demonstrando a adaptação da espécie bacteriana aos hospedeiros humanos. Apesar da afinidade de *C. diphtheriae*

aos hospedeiros humanos, *C. ulcerans* também vem se destacando como patógeno humano e nos últimos anos, vem sendo isolado de quadros de pneumonia (MATTOS-GUARALDI et al., 2008), úlceras de pele (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009) e abscessos subcutâneos (URAKAWA et al., 2013), além dos quadros de difteria.

Diagnostico laboratorial

Os espécimes clínicos obtidos para o isolamento de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* de quadros de difteria clássica devem ser coletados tanto da nasofaringe quanto da garganta e devem ser inoculados primeiro em um meio de cultura sólido, não seletivo e enriquecido com sangue e em meios seletivos tais como o Agar chocolate telurito ou agar Tinsdale. Na microscopia direta, os resultados destes materiais clínicos não apresentam confiabilidade para o diagnóstico direto. A presença de grânulos metacromáticos em bactérias bacilares coradas em azul na técnica de GRAM, tem sido documentada, mas não é uma característica exclusiva de *C. diphtheriae* e a interpretação do esfregaço requer conhecimento técnico especializado (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009). Ainda assim, estes microorganismos considerados “difteróides”, não devem ser prontamente descartados como meros contaminantes, especialmente se encontrados em materiais clínicos nobres, ou seja, provenientes de sítios estéreis, tais como, sangue e líquor. Tal observação pode ser enfatizada pelo fato de que algumas amostras de *C. diphtheriae* podem exibir comportamentos atípicos, como fermentação de sacarose (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1998).

O *C. diphtheriae* é identificado por sistemas convencionais e semi-automatizados. Atualmente, o teste DNase tem sido incluído nos testes de triagem conforme descrito por Pimenta et al. (2008a), tendo em vista que todas as cepas de *C. diphtheriae* até o momento são produtores de DNase.

O diagnóstico laboratorial da difteria por sistemas convencionais é baseado em características morfo-coloniais, morfo-tintoriais e diversas provas bioquímicas. *C. diphtheriae* apresenta atividade de catalase, cistinase, redução do nitrato (exceção para amostras da subsp. *belfanti*), metabolismo fermentativo para glicose, maltose e

sacarose (variável), glicogênio (somente para a subsp. *gravis*) e crescimento em ágar chocolate com telurito. Não apresenta motilidade, não necessita de lipídeos para o seu crescimento em cultura (exceção para a subsp. *intermedius* que é lipofílica), tampouco, apresenta atividades de urease, pirazinamidase, fosfatase alcalina, de hidrólise de gelatina e esculina, fermentação de manitol, xilose, e reação de CAMP (COYLE & LIPSKY, 1990; FUNKE et al, 1997; JANDA, 1998; EFSTRATIOU & GEORGE, 1999; MACFADDIN, 2000; FUNKE & BERNARD, 2003; KONEMAN et al., 2006). A espécie *C. ulcerans* se diferencia por possuir urease e produzir uma fosfolipase D que inibe a hemólise (CAMP reverso) de amostras de *S. aureus* produtoras de β lisina (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009). O sistema semi-automatizado API Coryne, tem se mostrado uma ferramenta bastante eficiente no auxílio da identificação do *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, exceto pela fermentação lenta da maltose (PEREIRA, 2001).

Uma das etapas do diagnóstico em materiais colhidos de casos suspeitos de difteria é a análise da produção de toxina diftérica pelos isolados do material clínico. Os imunoenaios são amplamente utilizados para tal fim. Por exemplo, o teste de Elek realizado com a incorporação de anticorpo antitoxina diftérica em tiras de papel de filtro que analisa a formação de precipitados antígeno/anticorpo, permanece como método convencional utilizado pela maioria dos laboratórios em todo o mundo, e recomendado para a confirmação diagnóstica de difteria. Entretanto, pode fornecer resultados pouco confiáveis, particularmente quando utilizada mão de obra não qualificada. Tal fato fez com que este método tenha sofrido modificações ao longo do tempo (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009). O teste de imunodifusão radial simples (IDR), que se baseia na incorporação de diluições da TD no meio de cultivo Herman, é utilizado nos laboratórios de Saúde Pública no Brasil desde a década de 80 por se apresentar como um método simples e tão eficaz quanto o método de Elek (que utiliza tiras de papel impregnadas com antitoxina diftérica), com a vantagem de permitir a detecção de amostras fracamente produtoras de toxina (PESSÔA et al., 1981, FORMIGA, 1986).

Os ensaios em culturas de células eucarióticas Vero de linhagem contínua e os testes em coelhos ou cobaias na pesquisa de toxicidade, são consideradas técnicas padrão-ouro para comprovação da toxinogenicidade, porém apresentam elevado custo e difícil execução, inviabilizando sua utilização na rotina laboratorial (HENRIKSEN & GRELLAND, 1952; BASEMAN et al., 1970; MIYAMURA et al., 1974;

MURPHY, BACHA & TENG, 1978; CARNE & ONON, 1982; NIELSEN et al., 1987; MACHADO, 1989; EFSTRATIOU et al., 1998). Além disso, na atualidade, existem impedimentos quanto ao uso de animais para análise de produção de toxina em modelos animais tais como cobaias.

Atualmente, as técnicas moleculares passaram a ser utilizadas como ferramentas adicionais no diagnóstico bacteriológico da difteria (PIMENTA et al., 2008b). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de genes específicos foi desenvolvida pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) para ser aplicada como método alternativo de detecção do gene codificador da TD (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009). O PCR é capaz de detectar a presença do gene *tox* em isolados diretamente de amostras clínicas (p. ex., material da pseudomembrana diftérica coletado com *swabs* ou material coletado de biópsia). Embora o PCR permita um diagnóstico rápido e específico, pode também fornecer resultados positivos para amostras que são carreadoras do gene *tox*, mas que não estão produzindo a toxina, presumivelmente devido à expressão do repressor da toxina diftérica (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2009). A técnica descrita por Pimenta et al. (2008b), também tem se demonstrado de grande eficácia na detecção de amostras de *C. diphtheriae* e do gene *tox*. Além disso, técnica de PCR multiplex foi desenvolvida para o diagnóstico de amostras potencialmente toxigênicas para identificação de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* possuindo genes para a TD (TORRES et al., 2013).

Justificativa e relevância da proposta

Conforme abordado, a utilização de anticorpos produzidos em animais contra a TD possui importância fundamental na caracterização de cepas produtoras de toxina. No Brasil e no exterior, utiliza-se o SAD como reagente a ser impregnado nas tiras para o teste de Elek. Entretanto, caracterizações acerca da presença de anticorpos da classe IgG, direcionados a outros antígenos do bacilo diftérico, são necessárias para a utilização de tais anticorpos, devido à presença de linhas de precipitação variadas quando se utiliza uma fonte de anticorpos pouco caracterizada

para esta finalidade, como no caso do SAD. Este aspecto pode gerar resultados falso-positivos ou mesmo confusos, devido à presença de linhas de precipitação variadas. Sendo assim, tornou-se necessário a utilização de um anticorpo produzido em animal que fornecesse resultados com maior especificidade, além de ser imprescindível a obtenção de um soro pré-imune, tendo em vista que o SAD não acompanha o soro obtido antes da imunização do cavalo para verificar a ausência de reatividade prévia com a toxina ou com componentes presentes na superfície microbiana. Em adição, pouco se sabe acerca da expressão da toxina diftérica na superfície das amostras de *C. diphtheriae*, que pudesse favorecer o diagnóstico das amostras de *C. diphtheriae* em material clínico.

Deste modo, a produção de anticorpos anti-TD em coelhos, nos orientará no diagnóstico laboratorial das cepas produtoras de toxina diftérica através dos métodos de imunodifusão radial simples (IDR) e dupla (Elek modificado), dando mais qualidade nestes imunoenaios; fornecerá aspectos positivos para o diagnóstico específico da doença, quando dos processos infecciosos por cepas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* toxinogênicas; além da aplicação em diversos objetivos.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

A presente investigação teve como objetivo principal a produção de anticorpos policlonais anti-TD em coelhos para avaliação da produção de toxina diftérica por cepas toxinogênicas e de amostras de origens diversas de *C. diphtheriae* e o potencial para a sua utilização como método diagnóstico das amostras toxinogênicas de bacilo diftérico.

1.2 Específicos

Neste sentido, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Produção de anticorpos policlonais a partir da imunização de animais (coelhos New Zealand White) com toxina diftérica;
- b) Fracionamento dos anticorpos obtidos a partir da imunização de coelhos;
- c) Biotinilação (conjugação de biotina ao anticorpo) de IgG antitoxina diftérica adquirida da imunização dos coelhos;
- d) Pesquisa da presença de gene *tox* nas cepas utilizadas pela técnica de PCR multiplex;
- e) Pesquisa da produção de toxina diftérica empregando método de Elek-modificado;
- f) Pesquisa de citotoxicidade e neutralização em células eucarióticas de linhagem **Vero**;
- g) Pesquisa da expressão de TD na superfície bacteriana por ensaios de imunofluorescência usando o anticorpo biotinilado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Origem e manutenção das amostras bacterianas

Serão investigadas as seguintes amostras de *C. diphtheriae* (n=10) mantidas estocadas na bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC)/DIMI/FCM – UERJ: HC01, HC02, HC03, HC04, HC06 isoladas de quadros de endocardite; as cepas padrões toxinogênicas CDC-E8392 e TR241 isoladas de difteria; cepa PW-8 (padrão vacinal), além das amostras padrão *C. diphtheriae* ATCC 27010 (amostra padrão atoxinogênica) e ATCC 27012 (homóloga toxinogênica). Algumas características das cepas estudadas estão expostas no **Quadro 1**.

Quadro 1- Características das 10 amostras de *C. diphtheriae* estudadas

Amostra	Biovar	Sítio de isolamento	Quadro clínico
ATCC 27010 (atoxinogênica)	<i>mitis</i>	faringe	difteria
ATCC 27012 (toxinogênica)	<i>mitis</i>	faringe	difteria
CDC-E8392 (toxinogênica)	<i>mitis</i>	faringe	difteria
TR241 (toxinogênica)	<i>mitis</i>	faringe	difteria
PW-8 (vacinal)	<i>mitis</i>	faringe	vacinal
HC01	<i>mitis</i>	sangue	endocardite
HC02	<i>mitis</i>	sangue	endocardite
HC 03	<i>mitis</i>	sangue	endocardite
HC 04	<i>gravis</i>	sangue	endocardite
HC 06	<i>gravis</i>	sangue	endocardite

Legenda: ATCC – American Type Culture Collection, USA; CDC – Centers for Disease Control and Prevention, USA; PW – Park Williams; HC – hemocultura;

Fonte: O autor, 2016.

2.2 Confirmação da espécie e da presença do gene *tox* por mPCR

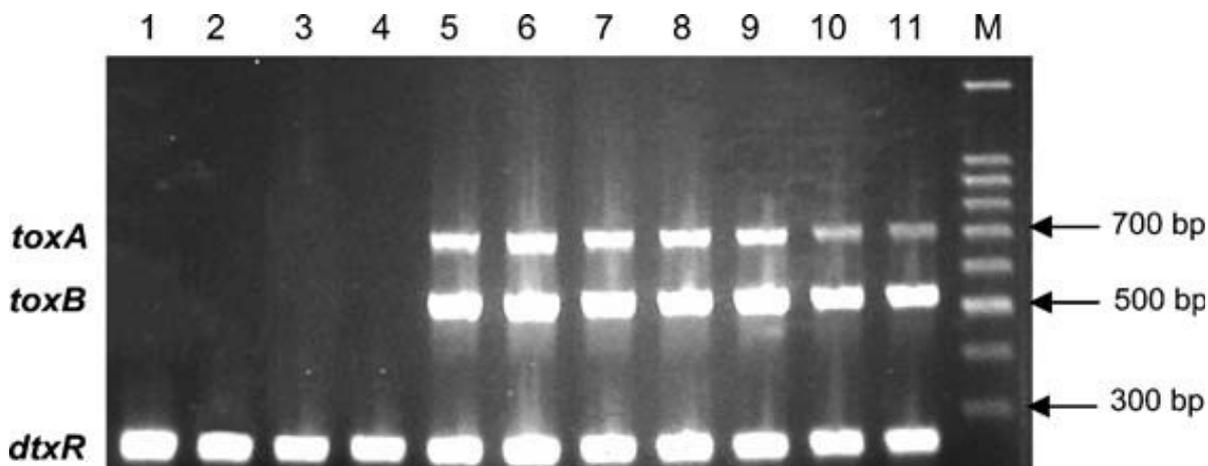
2.2.1 Ensaio de pcr multiplex (mPCR)

Para a confirmação da espécie bacteriana e do potencial de produção de TD, os ensaios foram realizados por metodologia previamente descrita por (NAKAO et al., 1996) e modificada por Pimenta et al., (2008b), que caracteriza a identificação de cepas de *C. diphtheriae* e a detecção do potencial de produção de toxina diftérica.

O ensaio de PCR multiplex foi realizado utilizando três pares de iniciadores que correspondem ao gene *dtxR* (DtxR1F e DtxR1R, 258 pb) e fragmentos das porções A (Dipht 2F e Dipht 4R, 719 pb) e B (Dipht 6F e Dipht 7R, 534 pb) do gene *tox*. Antes da aquisição dos iniciadores foi realizada a amplificação *in silico* para confirmação do protocolo (dados obtidos no site: insilico.ehu.es/PCR). O DNA bacteriano foi extraído a partir de cultivo de amostras de bacilo diftérico por 24 - 48h em meio Columbia Agar Base (CAB-Difco). O crescimento bacteriano foi ressuspensão em 0,5 ml de água ultra-pura estéril e submetido a processo de fervura, em banho-maria, durante 10 minutos.

A PCR foi iniciada empregando o processo de amplificação através da desnaturação inicial de 95°C/3 min.; 35 ciclos de 94°C/1 min; 55 °C durante 1 min e 72 °C por 1,5 min. A reação foi concluída com uma extensão final de 72 °C, durante 10 min. A presença do produto amplificado nas reações de PCR foi monitorada após eletroforese em gel de agarose a 2 %, (**Figura 4**).

Figura 4 – PCR multiplex para confirmação de espécie bacteriano e potencial toxinogênico



Legenda: Linha 1, ATCC 27010; linhas 2 a 4, isolados clínicos não-toxinogênicos; linha 5, ATCC 27012; linha 6, Park Williams 8 (PW8); linha 7, CDC E6651; linhas 8 a 11, isolados clínicos toxinogênicos; linha M, DNA ladder, 100 bp.

Fonte: PIMENTA et al., 2008b.

2.3 Experimentos de imunização de modelo animal com toxina diftérica

2.3.1 Considerações éticas

As experimentações realizadas *in vivo* com modelos animais, conforme descritas abaixo, foram certificados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **aprovado** pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (CEUA) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Protocolo n° CEUA/033/2015.

2.3.2 Modelo animal

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) de linhagem/raça New Zealand White. O número de coelhos (n=2), foi considerado o mínimo necessário

para a obtenção de anticorpos antiTD suficiente para a realização dos objetivos geral e específicos do presente estudo. No **Quadro 2**, encontram-se as principais características do modelo animal proposto.

2.3.2.1 Manutenção dos coelhos

Os coelhos foram mantidos em biotério (biotério da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do DMIP, FCM/UERJ) e alojados em gaiolas de aço inoxidável com cama de maravalha de pinho branco autoclavada. Os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* e mantidos em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (70%), e ciclo claro/escuro constante (período claro de 9 às 21h). As trocas das camas de maravalha foram realizadas duas vezes por semana (ANDRADE, PINTO & OLIVEIRA, 2002).

Quadro 2 - Principais características do modelo animal

Coelho - <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
Ordem	Lagomorpha
Família	Leporidae
Gênero	<i>Oryctolagus</i>
Espécie	<i>cuniculus</i>
Linhagem/raça	New Zealand White
Idade	Adulto (20 semanas)
Peso aproximado	2,5kg
Sexo	masculino
Quantidade	2

Fonte: adaptado de ANDRADE, PINTO & OLIVEIRA, 2002.

2.3.3 Produção de IgG antitoxóide diftérico

2.3.3.1 Aquisição de soro pré-imune

Antes da realização do protocolo de imunização, para a obtenção de soro pré-imune, os coelhos foram colocados em caixas de contenção (Instrulab) e tiveram o sangue coletado da veia central da orelha (5mL), em tubo de ensaio com gel separador sem anticoagulante. Após a coagulação (tubo permaneceu em repouso por no mínimo 30 minutos), fez-se a separação do soro por centrifugação a 2.000 RCF(g), (RCF-força centrífuga relativa; g- gravidade) por 4 minutos (TABORA, MEHNERT & SILVA, 2004). O soro foi coletado, e armazenado em freezer a -20°C (HARLOW & LANE, 1988). O procedimento de coleta de sangue e separação do soro foi realizado durante todo o processo de imunização.

Para verificar a reatividade do soro dos animais, estes, foram testados quanto à atividade neutralizante de toxina diftérica sobre células Vero, além da análise de reação antígeno-anticorpo através de ensaios de Elek-modificado em meio Hermann. Respostas negativas para Elek-modificado e as que apresentaram título neutralizantes $\leq 1:40$, foram utilizadas para o protocolo de imunização com toxina diftérica purificada dimerizada.

2.3.3.2 Imunização

A imunização ocorreu conforme procedimento descrito por Harlow & Lane (1988). O procedimento teve início com a utilização de toxina diftérica purificada (Sigma Chemical Co. Detroit, MI). Após a diluição da toxina em solução contendo PBS (solução salina tamponada 0.01M, pH 7.2), a solução passou por 4 ciclos de congelamento e descongelamento para a dimerização das moléculas (com perda de efeito citotóxico). A TD dimerizada foi diluída na concentração de 400µg/mL e para a primeira imunização do animal, diluída em partes iguais de adjuvante completo de Freund. A solução do antígeno foi emulsificada com uso de duas seringas de vidro

de 5mL conectadas a um *three-way*, onde os bombeamentos favoreceram a emulsificação do antígeno. Em seguida, o preparado foi injetado por via subcutânea na concentração de 100µg da toxina dimerizada por inoculação em total de 4 inoculações por via subcutânea em cada animal. Após 14 dias, uma alíquota de sangue foi obtida da veia central a orelha e analisada para a presença de anticorpos. Nova partida de antígeno foi preparada (na mesma concentração) com a diluição e emulsificação do antígeno em adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Novamente, o antígeno seguiu a inoculação por via subcutânea na concentração de 100µg de toxina dimerizada. Os procedimentos foram repetidos com adjuvante incompleto de Freund após mais 14 dias. Após 7 dias da última inoculação (42 dias após o início do protocolo de imunização), o sangue periférico foi extraído e o soro testado para a presença de anticorpos específicos através da técnica de Elek modificado. Após a demonstração da presença de apenas uma linha de precipitação entre o soro de coelho e o cultivo das cepas, foi realizada a última coleta do sangue.

Conforme Tabora, Mehnert & Silva (2004), os animais foram anestesiados (cetamina (50mg/Kg, IM)) e passaram por sangria de 30mL de sangue periférico. O sangue dos animais foi deixado para coagular em tubos Falcon de 50mL em volumes de 10mL. Em seguida, os tubos foram mantidos a 37°C por 1h e o soro foi coletado e centrifugado a 2.000 RCF(g) por 4 minutos. As alíquotas livres de células foram armazenados sem conservantes a -20°C para posterior purificação das IgG e biotinilação das moléculas de anticorpos (HARLOW & LANE, 1988) . Após a coleta dos volumes finais, os animais sofreram eutanásia com o tripo da concentração de cetamina administrada para anestesia (150mg/Kg via IM) (ANDRADE, PINTO & OLIVEIRA, 2002).

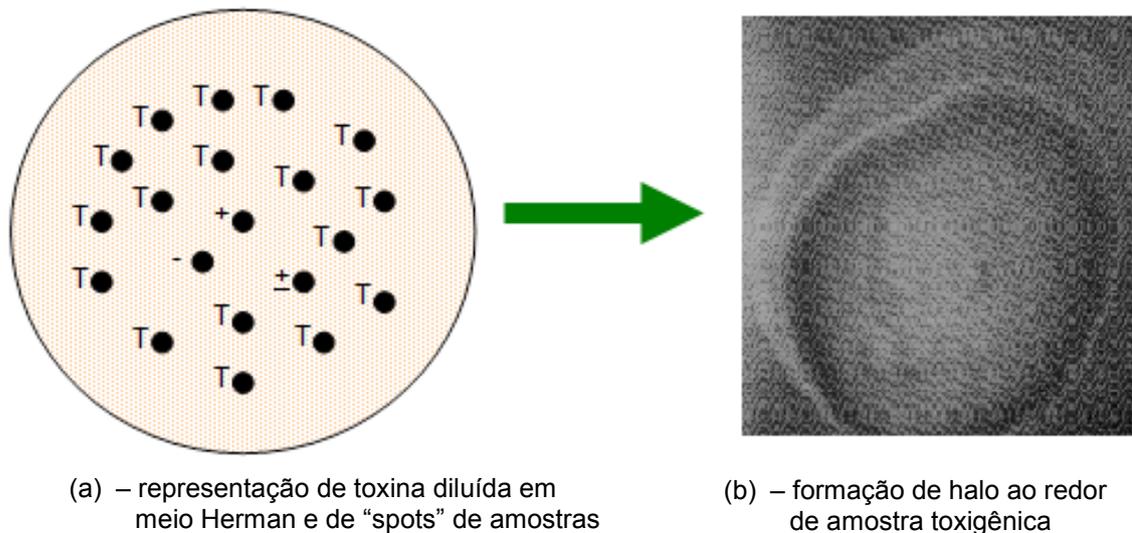
2.4 Pesquisa da produção de toxina diftérica empregando imunoenaios

2.4.1 Técnica de imunodifusão radial simples (IDR)

As amostras foram submetidas à técnica de IDR realizadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo anti-toxina diftérica nas concentrações finais de

1, 2, 4 e 8 UI/mL (Unidades Internacionais por mililitro) de SAD, adicionadas diretamente a 10mL de meio de Hermann acrescido de 2 ml aditivo (1% p/v casamino-ácidos, 1% v/v Tween-80, 1% v/v glicerol) e 0,4mL solução 1% p/v telurito de potássio. A semeadura das amostras foi feita em inóculos circulares (“spots”), a partir de um cultivo de 24-48h em meio B de King. Em cada procedimento, foram inoculadas as amostras padrão atoxinogênica (ATCC-27010) e toxigênica (ATCC-27012) para controle da reação. Posteriormente a etapa de incubação a 37°C por 48 h, foi realizada a investigação da presença de halos de precipitação em torno do crescimento bacteriano (PESSÔA et. al., 1981), (**Figura 5**).

Figura 5 – Imundifusão radial (IDR)



Legenda: T : toxina; + : amostra toxigênica; - : amostra atoxinogênica
 Fonte: adaptado de PESSÔA et. al., 1981.

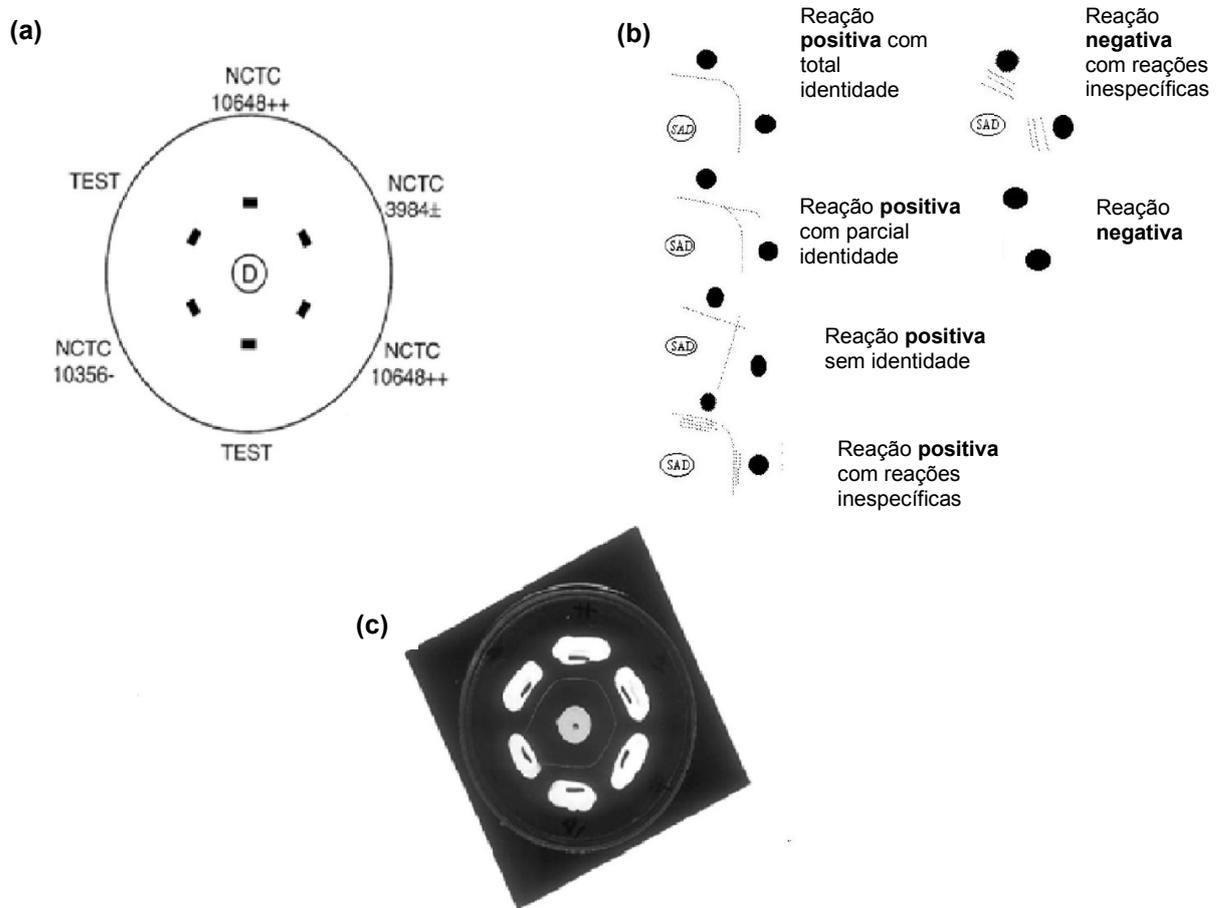
2.4.2 Elek modificado

A técnica de imunodifusão radial dupla descrita por Oliveira Lima & Dias da Silva (1970) e seguindo modificações descritas por Engler et al. (1997), foi realizada em placa de Petri contendo 10mL de meio Hermann acrescido de 2 ml aditivo (1% p/v casamino-ácidos, 1% v/v Tween-80, 1% v/v glicerol) e 0,4mL solução 1% p/v

telurito de potássio, onde foram feitos inóculos circulares (“spots”) das amostras ao redor de um disco de papel absorvente (4,5mm) localizado no centro da placa embebido com 12 μ L de soro anti-diftérico nas concentrações finais de 1, 2, 4 e 8 UI mL⁻¹ de SAD e nas diluições 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 de soro antitoxina diftérica gerada em coelhos, numa distância de 25 milímetro. As amostras-teste foram intercaladas com as amostras controle atoxinogênicas e toxinogênicas. Após a etapa de incubação (37°C por 48h), foi investigado o aparecimento de linhas de precipitação entre o disco central e o inóculo bacteriano. A especificidade da reação foi evidenciada pela fusão das linhas de precipitação em formato de joelho entre a amostra ATCC-27012 (*tox+*) e as amostras-teste. A ausência de linha de precipitação foi considerada como resultado negativo. O aparecimento de linhas múltiplas sem especificidade foram consideradas como reações inespecíficas (**Figura 6**).

A sensibilidade dos testes de IDR e Elek-modificado foi avaliada através do uso de TD purificada (Sigma, St Louis, MO, USA) utilizando quarenta microlitros em concentração inicial de 6,25ng mL⁻¹ e suas diluições (OLIVEIRA LIMA & DIAS DA SILVA, 1970; PESSÔA et. al., 1981; ENGLER et al., 1997).

Figura 6 – Elek-modificado



Legenda: (a) - Distribuição do disco e das cepas; (b) - possíveis maneiras de interpretação e diferentes padrões de linha (banda) de precipitação; (c) – presença de linhas de precipitação com identidade nas amostras toxinogênicas e ausência em amostra atoxinogênica ; D, disco com soro antitoxina diftérica; NCTC10648++, cepa toxinogênica; NCTC3984±, cepa toxinogênica; TEST, amostra teste; NCTC10356-, cepa atoxinogênica; NCTC, National Collection of Type Cultures; ■, sítio de inoculação.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA LIMA E DIAS DA SILVA, 1970; ENGLER et. al., 1997.

2.5 Ensaio de citotoxicidade com células Vero

2.5.1 Linagem celular, manutenção e controle de qualidade das células

Foi utilizada para a pesquisa de citotoxicidade as células de linhagem Vero derivadas de fibroblastos de rim de macaco verde africano.

A manutenção das células Vero deu-se em meio “Minimum Essential Medium Eagle” (meio MEM-Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (0,5% p/v), 5mg mL⁻¹ de gentamicina e 0,25mg mL⁻¹ de fungizona. As

passagens celulares foram feitas pelo tratamento do tapete celular com a solução de tripsina-EDTA (0,2% de tripsina e 0,02% de EDTA em salina tampão Dulbecco sem cálcio e magnésio, com 1% de vermelho de fenol). O excesso de solução de tripsina-EDTA foi removido e posteriormente, as células foram incubadas por 5 minutos. Após esse período, as células foram ressuspensas em 10mL de meio de cultura MEM para preparação das monocamadas (PERES & CURI, 2005).

Para avaliar a exclusão de contaminantes nas culturas celulares, foram realizados testes como marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que se liga fortemente ao DNA e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para micoplasma com os primers iniciadores GPO3 e MGSO conforme Peres & Curi (2005).

2.5.2 Pesquisa de citotoxicidade e neutralização em células eucarióticas de linhagem Vero

Na pesquisa de produção de TD foram investigados os efeitos de citotoxicidade, *in vitro*, produzidos pelos filtrados das culturas bacterianas e de neutralização de citotoxicidade mediado pelo SAD (MIYAMURA et al., 1974; MURPHY, BACHA & TENG, 1978; EFSTRATIOU et al., 1998). Para detecção de atividade biológica da TD produzida pelas diferentes amostras bacterianas, foram preparadas inicialmente suspensões de $2,5 \times 10^5$ células Vero em meio MEM acrescido de L-glutamina, antibióticos e 10% de SFB (EFSTRATIOU et al., 1998).

2.5.2.1 Obtenção e preparação das amostras bacterianas

Foram utilizados os filtrados (filtros Millipore, poro de 0,45µm de diâmetro) obtidos de cultivos bacterianos realizados em Líquido Hermann sem aditivos. Após centrifugação $10.000 \times g$ por 2min, os sobrenadantes foram filtrados e mantidos na temperatura de 4°C e utilizados durante o período máximo de uma semana (MACHADO, 1989).

2.5.2.2 Execução do teste

Inicialmente, os filtrados bacterianos foram inicialmente diluídos (1:5) em meio MEM contendo L-glutamina e 10% de soro fetal bovino e sucessivamente em log₂ X, em placas de cultura de células de 96 orifícios (Nunc). A cada orifício foram adicionados 50µL de suspensão contendo 5 x 10⁵ células Vero. As microplacas foram, então, incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 4 dias (EFSTRATIOU et al., 1998). Além dos teste-controle dos filtrados das amostras padrão atoxinogênica e toxinogênica, foram também realizados os teste-controle do meio MEM contendo L-glutamina e soro fetal bovino.

2.5.2.3 Avaliação qualitativa e quantitativa dos resultados

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste baseado na formação de cristais de formazana a partir da redução do brometo de dimetil-tiazol-difenil tetrazólio - MTT (Sigma) em função da atividade da enzima mitocondrial NADP(H) redutase. A formazana precipitada nas células metabolicamente ativas, de coloração azul, foi solubilizada em álcool isopropílico e avaliada a absorvância da solução, em comprimento de onda correspondente a 570nm (A₅₇₀). Alíquotas de 20µl de MTT (5mg⁻¹) foram adicionadas às culturas celulares e incubadas a 37°C por 2h em atmosfera de 5% de CO₂. Ao término do período de incubação, a solução de MTT foi removida e a cada orifício acrescentou-se 250µL de álcool isopropílico. Após homogeneização, duas alíquotas de 100µL da solução de formazana solubilizada foram retiradas de cada orifício e transferidas para uma nova microplaca para a leitura em espectrofômetro tipo “leitor de Elisa” (modelo 550, BioRad) em filtro de 570nm. A dosagem de TD produzida pelas amostras de bacilo diftérico foi comparada a absorvância mínima obtida no teste MTT com a absorvância obtida pelas diferentes concentrações de toxina diftérica purificada (Sigma). A curva padrão de atividade biológica da toxina diftérica purificada avaliada pelo teste do MTT foi estabelecida a partir de uma solução de 12,5ng mL⁻¹ de TD purificada. O título de citotoxicidade da TD purificada e dos filtrados bacterianos foi determinado

pela concentração de toxina diftérica capaz de matar 50% das células no ensaio (EC_{50}/mL) (EFSTRATIOU et al., 1998).

2.5.2.4 Neutralização do efeito citotóxico

Foram utilizados 1,0 e 0,1 UI/ml de SAD em alíquotas de 0,1 ml e distribuídas nos orifícios de microplacas, em seguida, foram adicionados 0,1 mL da toxina diftérica (Sigma) em diferentes concentrações. As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 1h (MACHADO, 1989). Após a incubação foi realizado o teste MTT conforme descrito no item 2.5.2.3 para a avaliação do efeito citotóxico. O mesmo procedimento foi realizado com o soro de coelho imunizado a partir da diluição 1:10, nos testes de neutralização sobre o efeito citotóxico produzido pela toxina diftérica. A menor diluição do SAD e a maior diluição do soro imune de coelho utilizada, foram incluídas entre os controles negativos da reação. As diluições do SAD e do soroimune de coelho que neutralizam a ação da toxina foram determinadas.

2.6 Precipitação, purificação e biotinilação de anticorpo específico anti-TD de coelho

2.6.1 Precipitação e purificação parcial dos anticorpos da fração gama globulina presentes no soro imune com sulfato de amônio

Misturou-se 5ml de soro imune com 5ml de PBS. Sob agitação cuidadosa, acrescentou-se gota a gota o volume calculado do sulfato de amônio a 100% de saturação para dar uma saturação final de 33%. Após permanecer agitando por mais 30 minutos, o volume foi transferido para tubos e centrifugados a 3000x g por 30 minutos. Após a lavagem, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 1 mL de PBS. O sedimento ressuspensado foi introduzido em saco de diálise e dialisado contra 10L de PBS por 3 dias a 4°C, com duas trocas de líquido de diálise ao dia. Por fim, a fração precipitada do saco de diálise foi retirada para

mensuração de concentração (HARLOW & LANE,1988; FARIA, BATISTA & HENEINE, 2013).

2.6.2 Biotinilação

Primeiramente preparou-se as soluções de N-hidroxisuccinimida biotina em 10 mg/mL de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) e uma outra solução de anticorpo com 2 mg/mL em tampão de borato de sódio (0,1 M, pH 8,8). Adicionou-se o éster de biotina ao anticorpo numa proporção de 50 µg por miligrama de anticorpo. Após homogeneizar bem, a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 4h. Passado este período, adicionou-se 20 µL de de NH₄Cl (1 M) por 250 ug de éster e incubou-se por durante 10 minutos em temperatura ambiente. Para a remoção do excesso de biotina não ligada, realizou-se extensiva diálise do anticorpo contra 12L de PBS por 3 dias a 4°C com troca do líquido de diálise duas vezes ao dia. Ao fim, os anticorpos foram alíquotados e armazenados a temperatura de -20°C (HARLOW & LANE, 1988).

Após a biotinilação, a concentração de IgG (em mg) foi mensurada em equipamento de microtitulação (Nanovue, GE Healthcare Life Sciences).

2.7 **Pesquisa da expressão de TD na superfície bacteriana por ensaios de imunofluorescência usando o anticorpo biotinilado**

2.7.1 Reação da imunofluorescência indireta (IFI) para detecção da expressão de TD em superfície bacteriana

Os ensaios de IFI foram realizados conforme previamente descrito por Harlow & Lane (1988). Na preparação dos esfregaços bacterianos em lâminas de fluorescência, foram adicionados 5 µL de suspensão contendo 10⁶ bactérias das amotras ATCC 27010 (atoxinogênica) e ATCC 27012 (toxinogênica), em seguida fixadas com emprego de calor. Em sequência, os poços fixados foram bloqueados

com 5uL de PBS contendo 1% de BSA e incubados por 1h a 37°C em câmara úmida. Após a incubação, os antígenos foram lavados com PBS e então adicionou-se streptavidina (SIGMA) incubando por 1h a 37°C para neutralizar ligações inespecíficas com biotina que possa ser produzida pelas cepas de *C. diphtheriae*. Completada a etapa, os anticorpos específicos de coelho anti-TD biotinilados foram diluídos (\log_2) e interagidos com os antígenos. Posteriormente, fez-se a interação de extravidina fluorescente conjugada com FITC (SIGMA) com os anticorpos biotinilados ligados ao antígeno seguido de incubação a 37°C por 30min. Após este período as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, secas e preparadas em glicerina tamponada para observação em microscópio de fluorescência. Diluições seriadas partiram de 1:10 de soro hiper-imune biotinilado. A presença de fluorescência na cepa toxinogênica duas diluições (4X) acima da diluição não fluorescente na cepa atoxinogênica, foi considerada como reação positiva.

2.8 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos ao menos três vezes. A análise da variância (one way ANOVA) pelo teste “t” de Student, quando necessária, foi utilizada para avaliação dos resultados através do programa Graphpad Prisma, sendo significativos os valores de $P < 0,05$ (HIRATA Jr. et al., 2004).

3 RESULTADOS

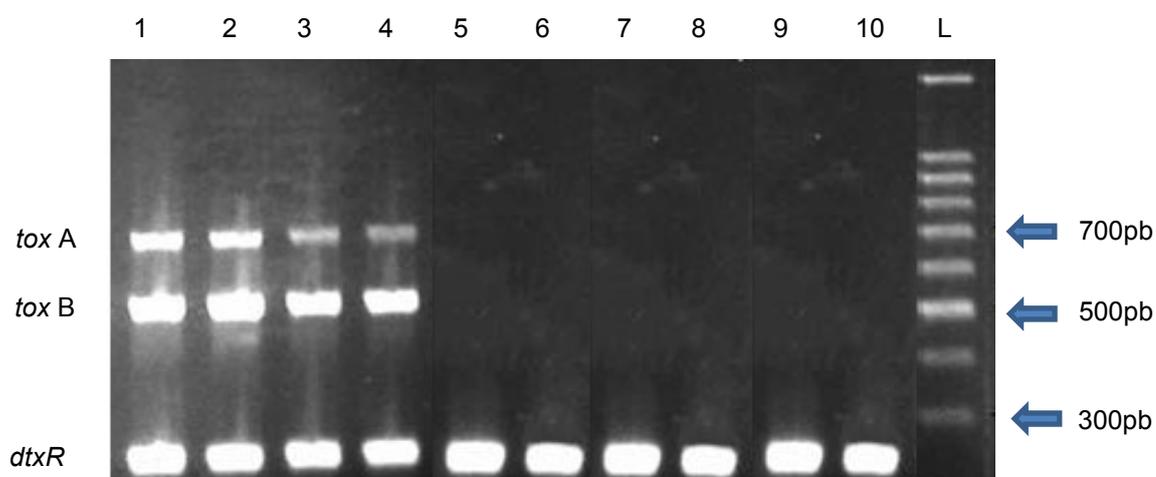
3.1 Confirmação das amostras bacterianas

Para a confirmação da pureza das cepas, espécie e toxigenicidade, as amostras foram descongeladas, cultivadas e submetidas aos testes bioquímicos e mPCR conforme descrito por Pimenta et. al. (2008a, 2008b).

3.1.1 PCR multiplex

Os resultados da investigação dos genes *dtxR* e dos fragmentos das porções A e B do gene *tox* pela técnica de mPCR para a confirmação das amostras-padrão e amostras-teste de *C. diphtheriae*, estão exibidos na **Figura 7** e no **Quadro 3**. Analisando os dados apresentados, pode-se observar a presença do gene *dtxR* em todas as amostras investigadas confirmando a espécie *Corynebacterium diphtheriae*. A presença dos fragmentos das porções A e B do gene *tox*, confirmou positividade das cepas toxinogênicas. As cepas ATCC-27010, HC01, HC02, HC03, HC04 e HC06 foram negativas para a amplificação das porções A e B do gene *tox*.

Figura 7 - Confirmação das amostras por PCR multiplex



Legenda: Linha 1, ATCC 27012; linha 2, CDC-E8392; linha 3, TR241; linha 4, PW-8; linha 5, ATCC-27010, linha 6, HC01; linha 7, HC02; linha 8, HC03; linha 9, HC04; linha 10, HC06; linha L, DNA ladder, 100 bp.

Fonte: O autor, 2016.

Quadro 3 - Pesquisa dos genes *dtxR* e dos fragmentos das porções A e B do gene *tox*, pela técnica de PCR multiplex em amostras de *C. diphtheriae*

Amostras	Biovar	Teste genotípico		
		<i>dtxR</i>	<i>toxA</i>	<i>toxB</i>
<i>C. diphtheriae</i>				
ATCC-27012	<i>mitis</i>	+	+	+
CDC-E8392	<i>mitis</i>	+	+	+
TR241	<i>mitis</i>	+	+	+
PW-8	<i>mitis</i>	+	+	+
ATCC-27010	<i>mitis</i>	+	-	-
HC01	<i>mitis</i>	+	-	-
HC02	<i>mitis</i>	+	-	-
HC03	<i>mitis</i>	+	-	-
HC04	<i>gravis</i>	+	-	-
HC06	<i>gravis</i>	+	-	-

Legenda: +, reação positiva; -, reação negativa; ATCC, American Type Culture Collection-USA; CDC, Centers for Disease Control and Prevention-USA; PW, Park Williams; HC, hemocultura.

Fonte: O autor, 2016.

3.2 Confirmação de toxigenicidade das cepas por imunoenaios

Técnicas imunológicas foram realizadas para avaliar a capacidade de produção de toxina diftérica das cepas investigadas no presente estudo. As amostras foram submetidas aos ensaios de IDR, Elek modificado utilizando SAD e soro imune de coelho, além de prova de citotoxicidade em células Vero de linhagem contínua. A observação dos halos em torno das cepas semeadas observadas através do ensaio de imunodifusão radial e a formação de linhas de precipitação foram analisadas por dois pesquisadores experientes.

Quanto à capacidade de neutralização da toxina diftérica pelo SAD e pelo soro imune de coelhos utilizados nas técnicas acima citadas, os mesmos foram submetidos à ensaios de soroneutralização com toxina diftérica padrão (SIGMA).

3.2.1 Ensaio de IDR e Elek modificado com SAD

No **Quadro 4**, encontram-se disponíveis os resultados da análise do teste de IDR e Elek modificado com SAD realizadas em cepas padrões e amostras clínicas de *C. diphtheriae*. Os dados apresentados demonstram reação positiva nas amostras padrões toxinogênicas ATCC-27012, CDC-E8392, PW-8, TR241 e nas cepas HC01, HC02 e HC03 (consideradas atoxinogênicas pelo ensaio de mPCR) nos ensaios de IDR. A amostra HC04, apresentou variabilidade dentro do mínimo de três repetições em triplicata. Reações negativas foram observadas somente nas cepas padrão atoxinogênica ATCC-27010 e na amostra clínica HC06. Além da reatividade observada para cepas consideradas atoxinogênicas pelo mPCR, através do ensaio de IDR, o ensaio de Elek Modificado mostrou diversas linhas de precipitação com as amostras, demonstrando que o SAD utilizado na terapia da difteria apresenta reatividade contra diversos componentes de *C. diphtheriae*, além do toxóide diftérico utilizado na imunização dos cavalos. Foram observadas bandas inespecíficas com identidade entre todas as cepas analisadas na presente investigação, exceto para as cepas ATCC 27010 e HC06. As cepas padrões toxinogênicas ATCC-27012, PW-8 e a amostra clínica HC03, apresentaram reação positiva para a presença de toxina diftérica. Linhas de reatividade à toxina não foram observadas para as amostras HC01 e HC02, apesar de ter ocorrido diversas linhas de precipitação inespecíficas com a utilização do SAD, justificando o encontro de positividade no ensaio de IDR. As cepas TR241 e CDC-E8392 (toxinogênicas pelo ensaio de mPCR) e a cepa HC04 (atoxinogênica pelo PCR) apresentaram linhas tênues de precipitação relativas à toxina diftérica. Tais aspectos parecem estar relacionados à expressão da toxina diftérica pelas cepas toxinogênicas, e constitui uma incoerência para a cepa HC04, tendo em vista que a mesma não teve o gen *tox* amplificado pelo PCR.

Quadro 4 - Resultados de IDR e Elek-modificado com SAD em cepas padrões e amostras clínicas de *C. diphtheriae*

Amostras	Biovar	Teste de toxinogenicidade	
		IDR	Elek-modificado
ATCC-27012	<i>mitis</i>	+	+ a
ATCC-27010	<i>mitis</i>	-	-
CDC-E8392	<i>mitis</i>	+	(+)a
PW-8	<i>mitis</i>	+	+a
TR241	<i>mitis</i>	+	(+)a
HC01	<i>mitis</i>	+	-a
HC02	<i>mitis</i>	+	-a
HC03	<i>mitis</i>	+	+a
HC04	<i>gravis</i>	V	(+)a
HC06	<i>gravis</i>	-	-

Legenda: +, positiva; (+), fracamente positiva; -, negativa; V, variável; a, bandas inespecíficas com identidade; ATCC, American Type Culture Collection-USA; CDC, Centers for Disease Control and Prevention-USA; PW, Park Williams; HC, hemocultura.

Fonte: O autor, 2016.

3.2.2 Ensaio de Elek modificado com Soro de Coelho

Soros de coelhos obtidos a partir de punção da veia central da orelha foram testados para a reatividade através dos ensaios de Elek modificado. Os soros pré-*imunes* não mostraram reatividade quanto aos testes de Elek modificado para nenhuma das cepas analisadas. Após o protocolo de imunização em coelho, os soros dos animais passaram a fornecer resultados com maior precisão e acurácia do que os resultados obtidos de Elek modificado com a utilização do SAD. Com exceção da cepa HC03, que apresentou resultados conflitantes, as cepas de *C. diphtheriae* que não apresentaram amplificação pelo método de PCR para o gene *tox*, não apresentaram linhas de precipitação ao Elek modificado contra a toxina. Não foi evidenciado a formação de bandas inespecíficas com a utilização do soro de coelho (**Quadro 5**).

Quadro 5 - Comparação dos resultados das técnicas de mPCR; IDR e Elek modificado com SAD; e Elek modificado com soro anti-TD de coelho

Amostra	Biovar	Teste de toxigenicidade			
		mPCR	IDR (SAD)	Elek modificado (SAD)	Elek modificado (coelho)
<i>C. diphtheriae</i>		gene tox			
ATCC-27012	mitis	+	+	+a	+
ATCC-27010	mitis	-	-	-	-
CDC-E8392	mitis	+	+	(+)a	(+)
PW-8	mitis	+	+	+a	(+)
TR241	mitis	+	+	(+)a	(+)
HC01	mitis	-	+	-a	-
HC02	mitis	-	+	-a	-
HC03	mitis	-	+	+a	V
HC04	gravis	-	V	(+)a	-
HC06	gravis	-	-	-	-

Legenda : +, positiva; (+), fracamente positiva; -, negativa; V, variável; a, bandas inespecíficas com identidade; ATCC, American Type Culture Collection-USA; CDC, Centers for Disease Control and Prevention-USA; PW, Park Williams; HC, hemocultura.

Fonte: O autor, 2016.

3.2.3 Teste de toxigenicidade em células Vero de linhagem contínua

Na **Tabela 1** encontram-se os resultados do efeito citopático em células Vero das amostras de *C. diphtheriae*. Os dados estão expressos pela titulação em que ocorreu 50% de morte celular (EC_{50}/mL). A cepa que apresentou maior toxicidade para as células Vero foi a cepa padrão ATCC-27012 (toxigenica), com título de 25600. O sobrenadante de cultivo em meio Hermann das cepas clínicas isoladas de quadros de endocardite (HC01 a HC06), além da cepa ATCC 27010 (cepa padrão não toxigenica) não demonstraram efeito citotóxico, quando comparado ao controle negativo (meio de cultivo sem semente bacteriana).

A concentração da toxina em ng/mL foi estabelecida a partir da curva demonstrada no **Gráfico 2**.

Tabela 1 - Avaliação do efeito citotóxico em cultura de células Vero de amostras de *C. diphtheriae*

<i>Amostra</i>	<i>Título - Ec₅₀/mL</i>	<i>Toxicidade relativa(%)</i>	<i>Concentração da toxina(ng/ml)</i>
ATCC-27012	25600	100	282,9
ATCC-27010	0	0	0
HC01	0	0	0
HC02	0	0	0
HC03	0	0	0
HC04	0	0	0
HC06	0	0	0

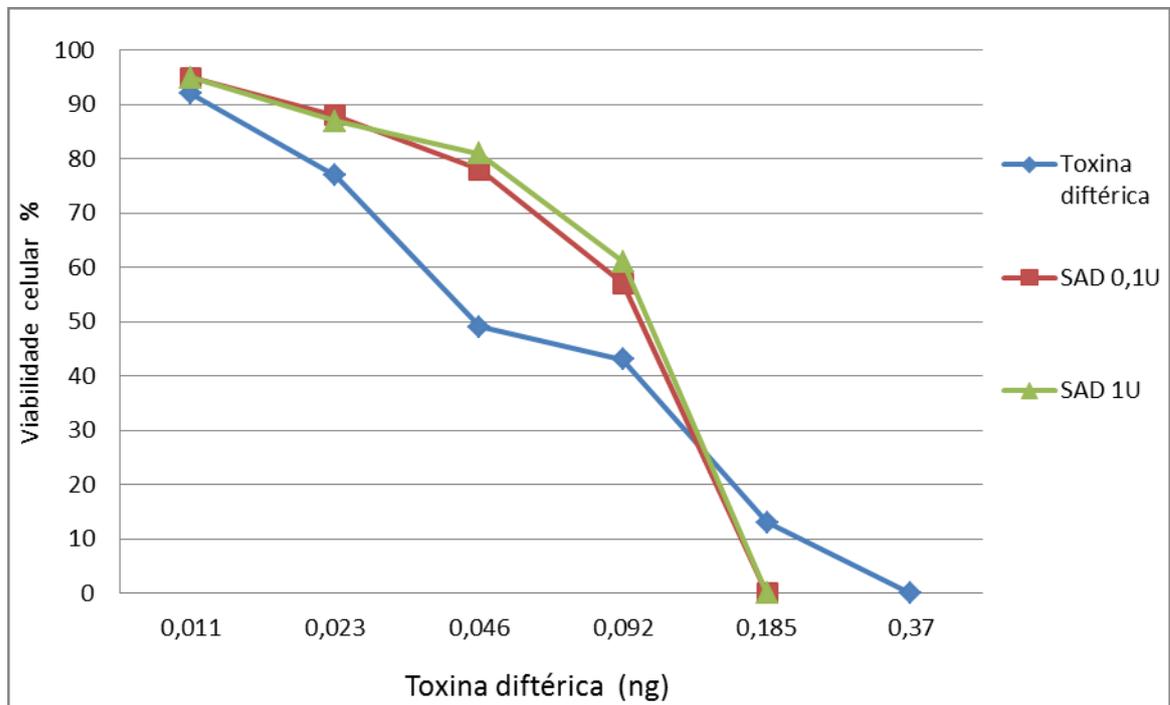
Legenda : Ec₅₀/mL, Título onde ocorreu 50% de morte celular; ATCC, American Type Culture Collection-USA; HC, hemocultura.

Fonte: O autor, 2016.

3.2.4 Soroneutralização com SAD

A avaliação da eficácia do SAD utilizado e a constatação de que o efeito citotóxico sobre as células Vero foi da ação da toxina diftérica, estão expostas no **Gráfico 2**. Analisando a curva do efeito citotóxico da toxina diftérica padrão sobre as células Vero, observa-se que a concentração que garantiu 50% de morte celular foi de 0,046ng/mL. Neste ponto, ocorreu neutralização do efeito citotóxico pelo SAD nas concentrações de 1UI/mL (Unidades Internacionais por mililitro) e 0,1UI/mL aumentando em torno de 80% a viabilidade celular. Pode-se considerar total neutralização (95%) na concentração de 0,011ng de toxina diftérica. A neutralização do efeito citotóxico também foi observada quando da análise do sobrenadante do cultivo da amostra padrão toxinogênica ATCC-27012 nas concentrações de 1UI/mL e 0,1UI/mL de SAD.

Gráfico 2 - Viabilidade de células Vero frente a toxina diftérica padrão e neutralização do efeito citotóxico com a utilização de soro anti-toxina diftérico (SAD) a 0,1 e 1UI



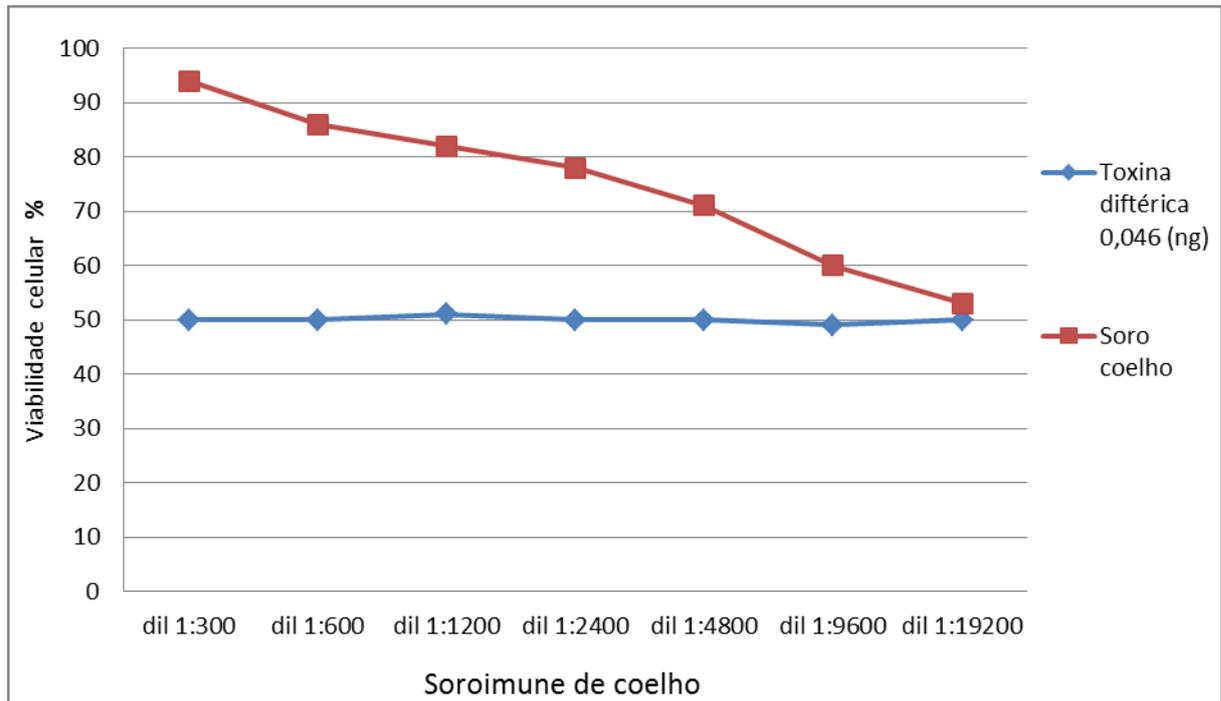
Legenda : U ou UI, unidades internacionais; (ng), nanograma.

Fonte: O autor, 2016.

3.2.5 Soroneutralização com o soro de coelho

Os experimentos de neutralização com o soro imune de coelho mostraram que a diluição de neutralização equivalente a 0,1UI de SAD foi a diluição de 1:1200. Ou seja, a diluição que neutralizou a toxina, permitindo um percentual de viabilidade das células Vero equivalente a aproximadamente 80% de viabilidade celular (**Gráfico 3**). Com o soro pré-imune de coelho não houve neutralização do efeito citopático, mostrando que não havia anticorpos presentes na amostra, capazes de neutralizar o efeito citotóxico sobre as células Vero.

Gráfico 3 - Soroneutralização e titulação do soro anti-TD de coelho



Legenda : dil, diluição; (ng), nanograma.

Fonte: O autor, 2016.

3.3 Imunofluorescência indireta

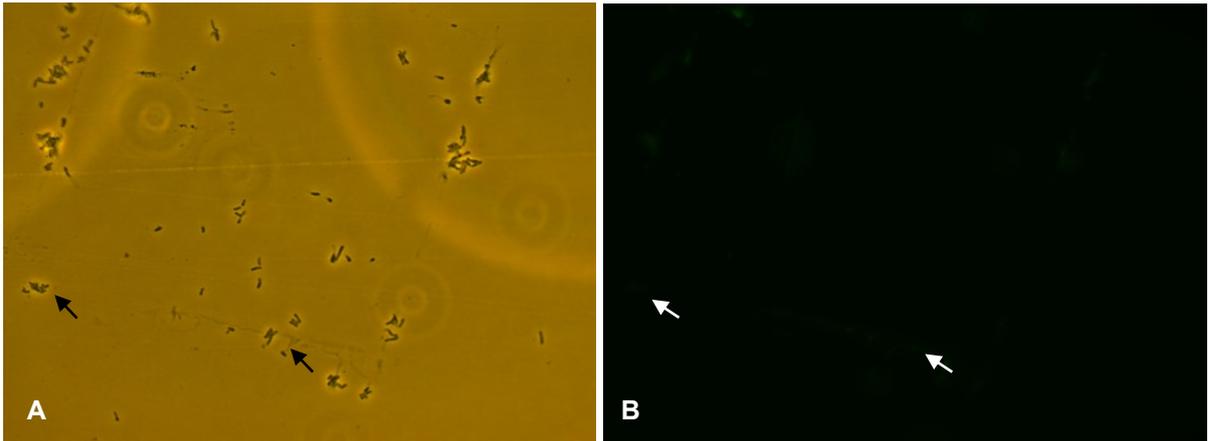
Após o protocolo de biotilação das IgGs, com a diálise extensiva da amostra frente ao PBS, foi produzida a solução dos anticorpos biotinizados (fração pseudoglobulinas). A determinação da concentração de imunoglobulinas foi de 6mg/mL, após a diluição de anticorpos 1:1000 em PBS, com coeficiente de distinção de 13,2.

Os resultados da imunofluorescência das bactérias padrões ATCC-27010 (atoxinogênica) e ATCC-27012 (toxinogênica) tratadas com o anticorpo antiTD biotinizado de coelho e conjugado com estreptavidina-FITC (SIGMA), estão expostos nas **Figuras 8 e 9**, respectivamente.

Na **Figura 8-A e 8-B**, campo 1, estão exibidas as bactérias da cepa não produtora de toxina (ATCC-27010) após tratamento com anticorpo antiTD biotinizado diluído em **1:80** e reação com estreptavidina-FITC. A visualização em microscopia por contraste de fase com aumento de 1000x mostra os micro-organismos dispersos com formação de grumos, em conformação típica de *C. diphtheriae* (figura 8-A). Na

Fig. 8-B pode ser evidenciada a ausência de reação de fluorescência para a amostra não toxinogênica, ATCC 27010.

Figura 8 - Imunofluorescência de *C. diphtheriae* ATCC-27010 (atoxinogênica) tratada com anticorpo anti-TD biotilado de coelho e estreptavidina-FITC na diluição **1:80**

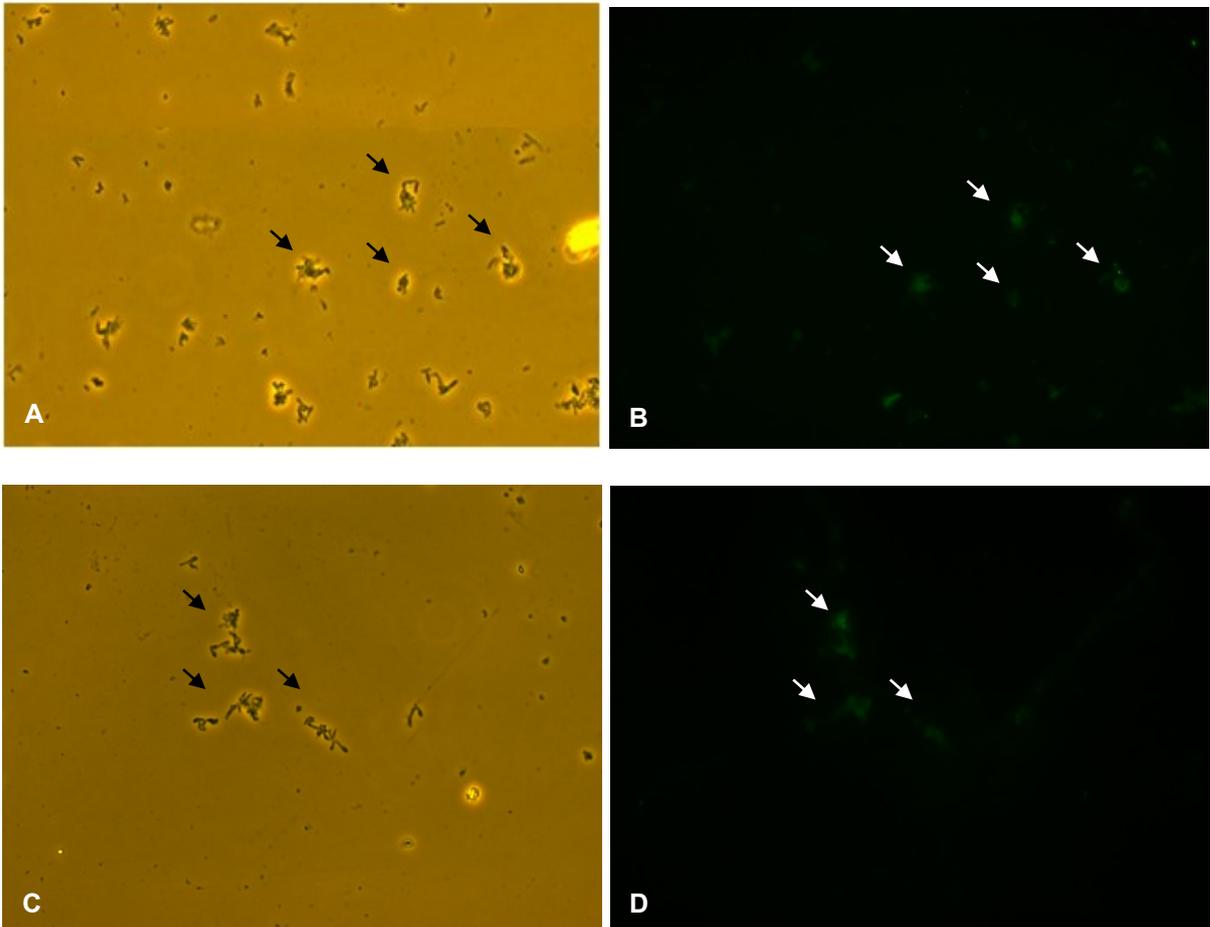


Legenda : **A**, campo 1 com presença de bactérias visualizadas por microscopia de fase; **B**, imunofluorescência do campo 1 .

Fonte: O autor, 2016.

Os resultados da amostra padrão toxinogênica ATCC-27012 após tratamento com anticorpo antiTD biotilado diluído em **1:320** (duas diluições posterior onde se observou ausência total de fluorescência na cepa 27010) e estreptavidina-FITC, encontram-se na **Figura 9**. Na **Fig.9-A** (microscopia de fase, aumento-1000x), as bactérias encontram-se no mesmo arranjo da amostra não toxinogênica. Na **Fig. 9-B**, mesmo campo que **9-A** (campo 2, microscopia de fluorescência, aumento-1000x), é notória a fluorescência nos grumos bacterianos. O mesmo ocorre nas **Figuras 9-C** (microscopia de contraste de fase) e **9-D** (imunofluorescência).

Figura 9 - Imunofluorescência de *C. diphtheriae* ATCC-27012 (toxinogênica) tratada com anticorpo anti-TD biotinilado de coelho e estreptavidina-FITC na diluição 1:320



Legenda: **A**, campo 2 com presença de bactérias visualizadas por microscopia de fase; **B**, imunofluorescência do campo 2 ; **C**, campo 3 por microscopia de fase; **D**, imunofluorescência do campo 3.

Fonte: O autor, 2016.

4 DISCUSSÃO

A busca por métodos diagnósticos da produção de toxina diftérica por *C. diphtheriae* continua sendo fundamental para a maioria dos países que ainda apresentam casos de infecção do trato respiratório superior (difteria) pelo bacilo diftérico. Apesar do padrão de infecção vir sofrendo modificações quanto à idade da população alvo, e dos clones bacterianos envolvidos (em especial com o isolamento de *C. ulcerans* toxinogênico), o tratamento da doença ainda se fundamenta na administração do SAD, almejando a neutralização da toxina, produzida pelo micro-organismo na porta de entrada do processo infeccioso (GUARALDI & HIRATA, 2016).

O diagnóstico clínico é soberano, tendo em vista a necessidade da neutralização da toxina absorvida durante o processo infeccioso, e o diagnóstico bacteriológico normalmente leva em torno de 48 horas, tempo suficiente para que danos graves ao miocárdio e rins possam ser irreparáveis. Entretanto, a administração do soro antidiftérico aos pacientes nem sempre é realizada de forma adequada devido aos principais fatores: a- falta de experiência do corpo médico no processo de diagnóstico clínico e microbiológico da doença; b- deficiência de produção ou de distribuição do SAD pelos órgãos governamentais; c- contato prévio dos pacientes com antitoxinas produzidas em cavalos contra outros processos (picada de serpentes, administração prévia de soro anti-tetânico ou soro antirrábico), onde há risco do paciente desenvolver hipersensibilidade. Nessa situação é recomendada a dessensibilização do paciente (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2005).

A deficiência de produção ou da distribuição do SAD já foi comunicada em algumas ocasiões. Em comunicação pessoal aos orientadores do trabalho, Profs. Dra. Ana Luíza Guaraldi e Dr. Raphael Hirata Júnior, a Dra. Androula Efstratiou (Coordenadora do Setor de Difteria da Health Protection Agency, Colindale, UK) relatou dificuldade na aquisição do SAD na Europa, e que o Brasil era na época (2007) um dos países que ainda produziam o quimioterápico e fornecia à OMS para fins diagnósticos (informação verbal)¹. Assim, o SAD produzido no Brasil era o principal reagente utilizado no Reino Unido para confecção das tiras de Elek para o

¹ Comunicação pessoal aos Profs. Dra. Ana Luíza Guaraldi e Dr. Raphael Hirata Júnior, 2007.

diagnóstico da toxigenicidade. Um dos métodos mais utilizados e recomendado (pelos órgãos mundiais) para análise da produção da toxina diftérica é o método de Elek convencional ou modificado onde tiras ou discos de papel de filtro são embebidas com SAD, seca e utilizadas para o diagnóstico da produção da toxina através da reação de precipitação. Conforme comunicação pessoal com o Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior, mais recentemente, em 2013, uma paciente maior de idade, com suspeita de difteria foi internada no Hospital Universitário Pedro Ernesto. O infectologista encontrou problemas na aquisição do SAD através da Secretaria de Estado de Saúde, adquirindo duas ampolas de SAD. Na época, as duas ampolas eram as únicas disponíveis, naquela semana, para todo o Município do Rio de Janeiro, a serem utilizadas no tratamento de difteria (informação verbal)². Todos esses fatos ilustram a dificuldade na aquisição de SAD, tanto para a utilização como método imunoterápico como para a sua utilização no diagnóstico das amostras bacterianas produtoras de toxina diftérica. Justificando, portanto, a produção de anticorpos antitoxina diftérica em outros animais, incluindo coelhos, conforme o objetivo principal deste trabalho, para o diagnóstico da toxigenicidade das cepas de bacilo diftérico isoladas dos casos clínicos.

Em nosso estudo, a produção de anticorpos pelos coelhos após a imunização foi boa e os anticorpos produzidos foram capazes de fornecer resultados mais fidedignos quando da realização do teste Elek modificado, quando comparado com o SAD, o qual apresentou reatividades diversas, incluindo para as amostras consideradas não toxigênicas pelo teste de PCR. Os achados com os testes utilizando o SAD produzido em cavalos mostram que a idade dos animais no momento da imunização e a capacidade de reatividade contra outros antígenos do gênero *Corynebacterium sp.* poderiam interferir gerando resultados conflitantes quando do diagnóstico de amostras não toxigênicas isoladas de quadros invasivos, incluindo as cepas HC01 a HC06. O gênero *Corynebacterium* pode apresentar antígenos com reatividade cruzada, incluindo espécies, tais como *C. ulcerans*, além de outras, que podem gerar imunidade cruzada. Conforme os resultados apresentados, os coelhos não apresentaram anticorpos pré-ímmunes contra a TD e não forneceram resultados conflitantes (surgimento de bandas inespecíficas no Elek modificado) após o processo de imunização com TD dimerizada.

² Comunicação pessoal com o Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior, 2013.

Em 2002, Engler et al., descreveram um ensaio imunocromatográfico (ICS test) que utilizava o soro policlonal de cavalo para captura da toxina diftérica produzida por cepas toxinogênicas de *C. diphtheriae* e anticorpo monoclonal contra o fragmento A da toxina diftérica complexado ao ouro coloidal. Os autores encontraram 99% de concordância com o teste Elek, utilizado como padrão. Ensaio realizado por Mattos-Guaraldi et al. (2001), encontraram 76% de concordância, utilizando a mesma metodologia. Na época, o ensaio diagnosticou 7 cepas não toxinogênicas como sendo produtoras de toxina. Assim, resultados falso positivos são factíveis mesmo utilizando anticorpos monoclonais para a detecção da toxina capturada pelo anticorpo policlonal de cavalo. Nos ensaios de Engler et al. (2002), não houve informações acerca da origem do soro policlonal de cavalo utilizado na confecção das tiras de ICS, entretanto a fonte mais provável seja o SAD produzido no Brasil, uma vez que lotes de SAD já vinham sendo fornecidos ao exterior. Mais tarde, foi observado que uma cepa de *C. ulcerans*, isolada de quadro de pneumonia (*C. ulcerans* 809), apresentou reatividade contra o fragmento A (detectado através do ICS) e foi negativo na amplificação da região do fragmento A da toxina diftérica, através da reação de PCR. Na época, ocorreu amplificação pelo PCR das regiões da toxina correspondente aos domínios de ligação e de translocação. A cepa foi desta forma considerada como produtora de uma toxina similar (diphtheria like toxin) à TD (MATTOS-GUARALDI et al., 2008).

Tais resultados mostram o quanto é conflitante os resultados obtidos através de ensaios imunológicos, sendo necessária a análise da atividade citotóxica com a utilização de células Vero, considerado o padrão ouro fenotípico para a análise da produção de toxina diftérica pelo bacilo diftérico. Em nossos resultados, mesmo utilizando o soro de coelhos com resultados negativos nos soros pré-ímmunes, houve detecção de resultado positivo em uma cepa que deveria ser negativa através do teste de Elek modificado; apenas a cepa HC03 (atoxinogênica) apresentou resultados positivos no Elek realizado com o soro de coelho. O teste empregando soros de coelho sobre as 10 cepas utilizadas neste estudo apresentou 90% de correlação quando comparados com os resultados das células Vero. Estes resultados foram superiores àqueles obtidos com os ensaios imunocromatográficos, tendo em vista que o ICS apresentou correlação de 76%. Um nível de discordância foi maior quando da utilização do SAD na reação IDR (quatro cepas que não poderiam apresentar precipitação no Agar, apresentaram discordância, fornecendo o

valor final de 60% de concordância entre o IDR e a citotoxicidade para células Vero, valores muito baixos quando comparado com o soro de coelho. Sob o aspecto das discordâncias, o Elek modificado originou resultados melhores devido ao fato de ser possível observar a identidade da reação imunológica. Convém lembrar que os soros de cavalo podem de fato fornecer resultados positivos para antígenos de imunidade cruzada, gerando resultados falso-positivos no IDR.

Conforme observado, o soro policlonal de coelhos também foi capaz de neutralizar a toxina diftérica em células Vero. A neutralização da produção de toxina diftérica por *C. diphtheriae* é um ensaio funcional em cultura de células Vero que analisa a produção de anticorpos (especialmente da classe IgG) capazes de neutralizar o efeito citotóxico em células Vero. O ensaio é realizado com meios de cultivo líquido após o crescimento das amostras (no nosso caso, caldo Hermann sem aditivos) diluído em meio MEM. Foi avaliado com isso o potencial toxinogênico das amostras, se destacando a cepa ATCC-27012 como a que apresentou a maior concentração de toxina produzida (maior EC_{50} /mL, dados não apresentados), sendo por essa razão utilizada para comparar o efeito dos soros de coelho e SAD. O teste de atividade citotóxica para células Vero foram compatíveis com o PCR em 90% de correlação, o que denota a especificidade observada em ambos os ensaios.

Após a obtenção da fração de pseudoglobulinas (precipitação do soro dos coelhos com 33% de sulfato de amônio), a obtenção de anticorpos foi na concentração de 17.28 mg/mL, após a ressuspensão do material fracionado em 1/3 do volume original. A diluição correspondente à concentração de 0.1 UI de SAD foi a diluição de 1:1200 do soro hiperimune de coelho. Os resultados mostraram que o soro de coelho foi capaz de neutralizar a toxina diftérica, mostrando que os anticorpos produzidos pelo animal apresentaram atividade funcional na neutralização da toxina. Na fração das pseudoglobulinas, ocorre predomínio de IgG como moléculas de anticorpos, se assemelhando ao SAD produzido em cavalos. Com respeito ao SAD produzido a partir de soro de cavalos, a fração de imunoglobulinas é obtida a partir do fracionamento com etanol gelado. A precipitação com etanol gelado fornece resultados similares à precipitação com sulfato de amônio para soros de cavalo, quando se almeja a utilização das imunoglobulinas como métodos terapêuticos (LEVINE, 1952). Utilizamos o método de precipitação com sulfato de amônio por ser a mais recomendada para o fracionamento de imunoglobulinas séricas de coelho para a obtenção de anticorpos

da classe IgG (HARLOW & LANE, 1988; FARIA, BATISTA & HENEINE, 2013). Após a obtenção da fração do soro de coelho após tratamento com NH_4SO_4 a 33%, foram utilizados reagentes com similaridades de obtenção para as comparações realizadas neste trabalho (SAD e fração pseudoglobulinas do soro de coelho). Conforme observado, as análises realizadas mostraram superioridade dos resultados com a utilização de soro hiperimune de coelhos imunizados com a toxina diftérica dimerizada.

A biotilação da fração imunoglobulinas séricas de coelho permitiu a utilização das Igs para o reconhecimento da toxina diftérica na parede celular dos microrganismos. Tendo em vista que os grumos bacterianos que ficaram fluorescentes apenas nas células produtoras de toxina, ficando sem fluorescência na cepa atoxinogênica, foi possível demonstrar que as cepas toxinogênicas expressam, pelo menos temporariamente a toxina da parede celular. Autores sugerem ao longo dos anos que a toxina diftérica é uma toxina extracelular e que, em princípio, não permaneceria ligada à parede celular bacteriana durante a passagem através da mesma. A utilização dos anticorpos biotinizados provou que a toxina pode ser detectada nas cepas produtoras de toxina, através dos ensaios de fluorescência utilizando a estreptavidina conjugada a fluoresceína. Foi visto ainda que as bactérias produtoras de toxina foram melhor observadas quando elas estavam grumadas, onde provavelmente a toxina ficou mais retida pelos microrganismos.

Os resultados da fluorescência mostraram que é possível que durante a passagem pela parede a toxina seja reconhecida por anticorpos produzidos pelo hospedeiro. Apesar de autores sugerirem que a imunidade contra a toxina diftérica não interfira com o processo de colonização das cepas bacterianas (MATTOS-GUARALDI et al., 2003), pode acontecer de os anticorpos presentes nas secreções mucosas (em especial a IgA), por impedimento estérico, possam de fato interferir com a ligação bacteriana à superfície celular e interferir com o processo de colonização. Entretanto, esses aspectos constituem novos rumos para investigações acerca do efeito da imunidade à toxina diftérica sobre o processo de colonização do bacilo diftérico em superfícies eucarióticas.

Conforme os ensaios iniciais, os anticorpos biotinizados, obtidos em coelhos, apresentaram especificidade, uma vez que não foram capazes de reconhecer antígenos expressos pela cepa não toxinogênica (ATCC 27010), reconhecendo apenas a cepa toxinogênica (ATCC 27012). É de grande interesse pelos órgãos de

Saúde Pública, o desenvolvimento de kits rápidos de diagnóstico e a perspectiva de desenvolvimento de um método diagnóstico para a toxigenicidade das amostras parece ser um interesse comum. Uma vez que os anticorpos estão estocados na Disciplina de Microbiologia e Imunologia da FCM/UERJ, eles podem ser empregados para diversas finalidades incluindo o desenvolvimento de metodologias para diagnóstico rápido e identificação das cepas diversas de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, espécies potencialmente produtoras de toxina diftérica.

CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados foi possível concluir:

- a) Coelhos produziram anticorpos após a imunização com a toxina diftérica dimerizada, através de diversos métodos de análise;
- b) As análises da presença do gene *tox* mostraram fraca correlação da presença do gene com os resultados de IDR e com Elek modificado com o SAD, apresentando melhor correlação quando os métodos foram realizados com soro de coelho;
- c) A fração de imunoglobulinas do soro de coelho diluída a 1:1200 demonstrou capacidade de neutralização da toxina diftérica sobre células Vero equivalente a 0.1 UI de SAD;
- d) O protocolo de biotinylação das imunoglobulinas fracionadas a partir do soro de coelho permitiu a análise da presença da toxina na cepa toxinogênica de *C. diphtheriae* utilizada como modelo (ATCC 27012), não demonstrando fluorescência sobre o modelo não produtor de toxina (ATCC 27010).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ALEMAN, M. et al.; *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1996; v.209, p. 804-809.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S.; orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- BASEMAN, J.B. et al. Action of diphtheria toxin in the guinea pig. *J Exp Med* , 1970; 132: 1138-1152.
- BEAVIS, K. G.; WEYMOUTH, L. A. Cellular and molecular pathology of infectious diseases. Cellular and molecular pathogenesis. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, pp 219-244.
- BIO-MANGUINHOS. *Difteria: sintomas, transmissão e prevenção*, 2016. Disponível em: < [http:// www.bio.fiocruz.br/index.php/difteria-sintomas-transmissao-e-prevencao](http://www.bio.fiocruz.br/index.php/difteria-sintomas-transmissao-e-prevencao)>. Acesso em: 28 jan. 2016.
- BODLEY, J. W. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 832.
- BUCK, G.A. et al. DNA relationships among some tox-bearing corynebacteriophages. *Infect Immun*, 1985; 49: 679-684.
- CARNE, H.R.; ONON, E.O. The exotoxins of *Corynebacterium ulcerans*. *J Hyg Camb* 1982; 88: 173-191.
- CHANG, M.P. et al. Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity. *Science*, 1989a; 246: 1165-1167.
- CHANG, M.P. et al. Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis: evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. *J Biol Chem*, 1989b; 264: 15261-15267.
- COLLIER, R.J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon*, 2001; 39: 1793-1803.

COSTA, L. R. R.; SPIER, S. J.; HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Veterinary Microbiology*, 1998; v.62, p.135-143.

COYLE MB, LIPSKY BA. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev*, 1990; 3 (Suppl.3): 227-246.

DIAS, A.A. et al. *Corynebacterium ulcerans diphtheriae*: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de Saude Publica*, 2011; 45(6):1176-1191.

DRAPER, R.K.; SIMON, M.I. *The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm*: evidence for lysosomal involvement. *J Cell Biol*, 1980; 87: 849-854

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

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

EFSTRATIOU, A.; Comunicação pessoal aos Profs. Dra. Ana Luíza Guaraldi e Dr. Raphael Hirata Júnior, 2007.

ENGLER, K.H. et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *J Clin Microbiol*, 2002; 40: 80-83.

ENGLER, K.H. et al. A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol.*, 1997; 35: 495-498.

FARIA, R.A.D.; BATISTA, M.L.; HENEINE, L.G.D.; Purificação e caracterização de subtipos *slow-moving* e *fast-moving* de imunoglobulina G a partir de soro de coelho. *e-xacta*, Belo Horizonte, 2013; v. 6, n. 2, p. 55-60.

FORMIGA, L.C.D. Diagnóstico microbiológico da difteria. *Rev Bras Pat Clin*, 1986; 22: 52-58, 90-93, 122-130.

FREEMAN, V.J. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol*, 1951; 61: 675-688.

FUNKE, G. et al. Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 1997; 10:125-159.

FUNKE, G. & BERNARD, A.K. Coryneform Gram-positive rods. In *Manual of Clinical Microbiology*, ed. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, M.C. & Tenover, R.H. Washington DC, USA: ASM Press. pp. 472-501; 2007.

GALAZKA, A. M. The Changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. *J Infect Dis*, 2000; 181 (suppl 1) S2-S9.

GREENFIELD, L. et al. Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage β . *Proc Natl Sci USA*, 1983; 80: 6853-685

GROMAN, N.B. Evidence for the induced nature of the change from nontoxigenicity to toxigenicity in *Corynebacterium diphtheriae* as a result of exposure to specific bacteriophage. *J Bacteriol*, 1953; 66: 184-191.

GROMAN, N.B.; EATON, M. Genetic factors in *Corynebacterium diphtheriae* conversion. *J Bacteriol*, 1955; 70:637-640.

GROMAN, N.B. Conversion in *Corynebacterium diphtheriae* with phages originating from nontoxic strains. *Virology*, 1956; 2: 843-844.

GROMAN, N.B.; DEAN, C.K. Toxinogenicity in *Corynebacterium diphtheriae* after loss catalase, cystinase, or deoxyribonuclease activity. *Infect Immun*, 1973; 8: 442-445.

GROMAN, N.B. Conversion by corynephages and its role in the natural history of diphtheria. *J Hyg Camb*, 1984; 93: 405-417.

GUARALDI, A. L. DE M.; HIRATA JÚNIOR, R. *Diphtheria*. In: Jonathan M. Spector; Timothy E. Gibson. (Org.). *Diphtheria*. 2ed. Elk Grove Village, IL, US: American Academy of Pediatrics, 2016, v. 1, p. 101-107.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA / MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. , Brasília : Ministério da Saúde, 2005; 816p.

HADFIELD, T.L.; MCEVOY, P.; POLOTSKY, Y.; TZINSERLING, V.A.; YAKOVLEV A.A.; The pathology of diphtheria. *J Infect Dis*, 2000; 181: S116-S120.

HARLOW, E. & LANE D.; *Antibodies: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 353, 1988.

HENRIKSEN, S.D.; GRELLAND, R. Toxigenicity, serological reactions and relationships of the diphtheria-like corynebacteria. *J Pathol Bacteriol*, 1952; 64: 503-511

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

HIRATA Jr., R. Comunicação pessoal do Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior, Rio de Janeiro, 2013.

JANDA, W.M. *Corynebacterium* species and the coryneform bacteria Part I: New and emerging species in the genus *Corynebacterium*. *Clin Microbiol Newslett* , 1998; 20: 41-52.

JOHNSON, V.G. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 832-834.

KADIROVA, R.; KARTOGLU, H.Ü.; STREBEL, P.M. Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, 1995. *J Infect Dis* 2000; 181: S110-S115.

KONEMAN, E.W.; In Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

KURSTAK, E. et al. Enzyme immunoassays and related procedures in diagnostic medical virology. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 64, n. 3, p. 465-479, 1986.

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C.F.M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal*, v. 46, n. 3, p. 269–279, 2005.

LEMICHEZ, E. et al. Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol Microbiol*, 1997; 23: 445-457.

LESSNICK, S.L. et al. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 836-838.

LEVINE, L. The antitoxic activity and gamma globulin distribution in fractionated diphtheria and tetanus antitoxin of equine origin. *Br J Exp Pathol*. 1952; 33(2):190-195.

LIPMAN, N.S. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*, v. 46, n. 3, p. 258–268, 2005.

MACAMBIRA, R.P.; FORMIGA, L.B.; FORMIGA, L.C.D. Difteria: o grave prognóstico brasileiro. *J Bras Med.*, 1994; 66: 69-81.

MACFADDIN, J.F. Deoxyribonuclease (DNase) and thermonuclease (Tnase) tests. In *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Philadelphia, USA: LW&W. pp. 136-159, 2000.

MACHADO, T.L. Avaliação dos testes de toxigenicidade na comprovação da real atoxinogenicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos clínicos e portadores. Tese de Mestrado, Instituto de Microbiologia, UFRJ, 1989.

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

MATTOS GUARALDI, A. L. et al. The immunochromatographic method for toxin detection and the KINGDSU screening procedures as alternative in rapid laboratory diagnosis of *Corynebacterium diphtheria*. *General Meeting Of The American Society For Microbiology*. 101: 175, 2001.

MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. Diphtheria remains a threat to health in the developing world - An overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Brasil, 2003; 98: 987-993.

MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, June, 2008; vol.103 no.4 .

MATTOS-GUARALDI A. L.; HIRATA Jr., R.; DAMASCO, P. V. *Difteria no Brasil e no mundo: aspectos sobre o cenário atual*, Imunizações, suplemento 1, 2011.

MEKADA, E.; OKADA, Y.; UCHIDA, T. Identification of diphtheria toxin receptor and a nonproteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. *J Cell Biol*, 1988; 107: 511-519.

MIYAMURA, K. et al. Nishio S, Ito A, Muata R, Kono R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titre using Vero cells. *J Biol Stand* 1974; 2: 189-201.

MORRIS, R.E. et al. Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infect Immun*, 1985; 50: 721-727.

MOSKAUG, J.O.; SANDVIG, K.; OLSNES, S. Low pH-induced release of diphtheria toxin A-fragment in Vero cells. Biochemical evidence for transfer to the cytosol. *J Biol Chem*, 1988; 263: 2518-2525.

MOURA, B. Interferências em Imunoensaios. *Boletim técnico Hermes Pardini*, ano 2, n. 10, novembro 2010.

MURPHY, J.R.; BACHA, P.; TENG, M. Determination of *Corynebacterium diphtheriae* toxinogenicity by a colorimetric tissue culture assay. *J Clin Microbiol*, 1978; 7: 91-96.

MURRAY, P.T.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 6 ed. Ed. Elsevier, 2009.

NAKAMURA, L.T.; WISNIESKI, B.J. Characterization of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *J Biol Chem*, 1990; 265: 5237-5241.

NAKAO, H. et al. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxr*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 1711-1716

NIELSEN, P.B. et al. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxin-producing *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1280-1284.

NOBELPREIS. *O Prêmio Nobel*, 2016. Disponível em: <
<http://www.nobelpreis.org/portugues>> . Acesso em: 27 jan. 2016.

OLIVEIRA LIMA, A.; DIAS DA SILVA, W. Preparo e titulação de toxinas, toxóides e venenos. Titulação de soros antitóxicos e antipeçonhentos. *Imunologia, imunopatologia e alergia: métodos*. 1 ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1970; 307-314.

OLSON, J.C. Use of synthetic peptides and site-specific antibodies to localize a diphtheria toxin sequence associated with ADP-ribosyltransferase activity. *J Bacteriol*, 1993; 175: 898-901.

PAPPENHEIMER, A.M. Jr. Diphtheria toxin. *Ann Rev Biochem*, 1977; 46: 69-94.

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

PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clinical Infection Disease*, 1997; v.24, p.185-191.

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

PERES, C. M.; CURI, R.; *Como Cultivar Células*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

PESSÔA, M.H.R. et al. Reavaliação da técnica de imunodifusão radial para identificação de amostras toxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae*. *Rev Bras Pat Clin*, 1981; 17:69-73.

PIMENTA, F.P. et al. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol*, 2008a.

PIMENTA, F. P. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *JMM*, 2008b.

POPOVIC, T. et al. Molecular epidemiology of diphtheria. *J Infect Dis*, 2000; 181: S168-S177.

QUICK, M.L. et al. Epidemic diphtheria in the Republic of Georgia, 1993-1996: risk factors for fatal outcome among hospitalized patients. *J Infect Dis*, 2000 Feb;181 Suppl 1:S130-7.

ROLF, J.M.; EIDELS, L. Structure - function analyses of diphtheria toxin by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 1993; 61: 994-1003.

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

SANDVIG, K.; OLSNES, S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol*, 1980; 87: 828-832.

SANTOS, L. S. et al. Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects. *Epidemiol. Infect.*, 2014; p.1 a 8.

SCHMITT, M.P.; TALLEY, B.G.; HOLMES, R.K. Characterization of lipoprotein IRP1 from *Corynebacterium diphtheriae*, which is regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and Iron. *Infect Immun*, 1997; 65: 5364-5367.

SCHMITT, M.P. Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae hmuo* gene is regulated by iron and heme. *Infect Immun*, 1997; 65: 4634-4641.

SMITH, W.P. et al. Precursor in cotranslation secretion of diphtheria toxin. *J. Bacteriol*, 1980; 141:184-189.

TABORA, C.; MEHNERT, U.D.; SILVA, A.C. *Manual de Normas Técnicas*. Biotério de Experimentação Animal, Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo, 2004.

TORRES, L. F. C. et al. Multiplex polymerase chainreaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an

overview of human and animal infections, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2013. vol.108, no.3.

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. *J Bacteriol.*, Jun., 2012;194(12):3199-215.

UCHIDA, T.; GILL, D.M.; PAPPENHEIMER, A.M. Jr. Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carries by temperate phage β . *Nature*, 1971; 233: 8-11.

URAKAWA, T. et al. Subcutaneous abscess formation in the upper extremity caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Journal of Medical Microbiology*, 2013; 62, 489–493.

WASHINGTON D.C: American Society for Microbiology Press, 2007; 485-514.

WILSON, B.A. et al. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 834-835.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Vaccine-preventable diseases: monitoring system 2015 global summary* :Diphtheria reported cases, 2015a. Disponível em: < http://www.who.int/immunization_monitoring/globalsummary> . Acesso em: 27 jan. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Vaccine-preventable diseases: monitoring system 2015 global summary* : Incidence time series for Brazil (BRA), 2015b. Disponível em: < http://www.who.int/immunization_monitoring/globalsummary> . Acesso em: 27 jan. 2016.

YAMAIZUMI, M. et al. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 1978; 15: 245-250.

YUKIJI, S. et al. Properties of Coryneophage Attachment Site and Molecular Epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* Isolated from Humans and Animals in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2008; 61, 116-122.

ZUCKER, D.R.; MURPHY, J.R.; PAPPENHEIMER, A.M. Jr. Monoclonal antibody analysis of diphtheria toxin. II. inhibition of ADP ribosyl-transferase activity. *Mol Immunol*, 1984; 21: 795-800.