



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Dilzamar Veloso do Nascimento

**Construção, clonagem e expressão do fragmento B da toxina  
diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (cepa PW- 8) em  
*Mycobacterium bovis* BCG sub-cepa Moreau**

Rio de Janeiro  
2014

Dilzamar Veloso do Nascimento

**Construção, clonagem e expressão do fragmento B da toxina diftérica de  
*Corynebacterium diphtheriae* (cepa PW- 8) em *Mycobacterium bovis* BCG sub-  
cepa Moreau**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi  
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa

Rio de Janeiro  
2014

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

N244 Nascimento, Dilzamar Veloso do.  
Construção, clonagem e expressão do fragmento B da toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (cepa PW- 8) em *Mycobacterium bovis* BCG sub-cepa Moreau. / Dilzamar Veloso do Nascimento. - 2014.  
148 f.

Orientadora: Ana Luíza de Mattos Guaraldi.  
Coorientador: Geraldo Rodrigues Garcia Armôa.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. *Corynebacterium diphtheriae* - Teses. 2. Difteria - Teses. 3. *Mycobacterium bovis* - Teses. 4. Toxina Diftérica. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Armôa, Geraldo Rodrigues Garcia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.852.23

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

---

Assinatura

---

Data

Dilzamar Veloso do Nascimento

**Construção, clonagem e expressão do fragmento B da toxina diftérica de  
*Corynebacterium diphtheriae* (cepa PW- 8) em *Mycobacterium bovis* BCG sub-  
cepa Moreau**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de março de 2014.

Coorientador: Geraldo Rodrigues Garcia Armôa

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Danuza de Almeida Esquenazi

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Mattos Saliba

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Cristina de Souza Matos

Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Verônica Viana Vieira

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2014

## AGRADECIMENTOS

A professora Dr<sup>a</sup>. Ana Luíza de Mattos Guaraldi, FCM/UERJ pela amizade, carinho, confiança, crescimento acadêmico e pessoal. Minha querida orientadora, obrigada pela inestimável orientação e por me acompanhar nesta jornada.

Ao Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Pela orientação, confiança, incentivo e amizade. Obrigada por me acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e vida acadêmica.

Ao professor Dr. Raphael Hirata Júnior pela convivência e apoio constante, partilha do saber e valiosas contribuições ao longo deste trabalho.

Ao professor Dr. Odir Antonio Dellagostin UFPEL pela amizade e valiosa ajuda prestada ao longo deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup>. Elezer Lemes Bio-Manguinhos/FIOCRUZ pelo apoio e convivência constante com as experiências de padronização da expressão e purificação da proteína recombinante.

A Dr<sup>a</sup>. Denise Cristina de Souza Matos Bio-Manguinhos/FIOCRUZ pela amizade ao longo destes anos e padronização dos ensaios em cultura de células VERO.

A todos os amigos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico, LATER/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

A todos os amigos do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC/Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia-Centro Biomédico/UERJ, pelos bons momentos compartilhados.

Ao Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Especialmente a professora Dr<sup>a</sup>. Mariza Gonçalves Morgado pela formação de Iniciação Científica e Aperfeiçoamento Profissional, minha querida orientadora, pelos ensinamentos e direcionamentos rígidos de 1989-1992.

Aos pesquisadores Vera Bongertz, Maria da Gloria Bonecini de Almeida, Dumith Cherquer, Deise Luci e Ivan Neves Junior por fazerem parte de minha formação durante o tempo de convivência na Imunologia/Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

A coordenação da Pós Graduação em Ciências Médicas e seu atual representante. Professor, Dr. Rogério Lopes Rufino Alves.

Ao ex-diretor Dr. Akira Homma por ter permitido o desenvolvimento de parte deste trabalho em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

Aos Institutos de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos; PAPES II da FIOCRUZ); PRONEX, MCT/CNPq, Convênio 41 96 0881 00, FAPERJ 26/171.918/2000, CAPES e SR2-UERJ pelo suporte financeiro deste projeto.

## DEDICATÓRIA

Aos meus familiares que ficaram (especialmente a minha mãe Dinoráh) e aqueles que partiram (especialmente ao meu pai Manoel), por todo amor e carinho que me deram. Ao meu companheiro Reinaldo, aos nossos filhos Yuri e Geovana por me darem coragem e determinação em cada amanhecer.

O que se vê,  
antes não era;  
e o que era, não é mais.

*Leonardo da Vinci*



## RESUMO

NASCIMENTO, Dilzamar Veloso do. **Construção, clonagem e expressão do fragmento B da toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (cepa PW- 8) em *Mycobacterium bovis* BCG sub-cepa Moreau.** 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A vacina anti-diftérica de uso corrente no Brasil (DTP), embora de alta eficácia na prevenção da difteria, está associada com episódios de toxicidade e reatogenicidade no recipiente vacinal, resultantes de proteínas residuais derivadas do processo de produção ou detoxificação. Estratégias para o desenvolvimento de vacinas menos reatogênicas e ao mesmo tempo mais eficazes e economicamente viáveis contra a difteria têm sido alvo de intensa investigação. A alternativa proposta por nosso grupo é a utilização da vacina contra a tuberculose (*Mycobacterium bovis* BCG sub-cepa Moreau), como vetor do gene que codifica o fragmento B da toxina diftérica (*dtb*) de 58,3 kDa. Neste trabalho o *dtb* foi clonado no vetor micobacteriano bifuncional (pUS977) de expressão citoplasmática e os clones recombinantes (pUS977*dtb*<sub>PW8</sub>), após a transformação do BCG, foram testados com relação a expressão do DTB em BCG e quanto a antigenicidade frente a anticorpos policlonais anti-toxóide diftérico por *Immunobloting*. A integridade do gene *dtb* e a identidade das sequências de DNA da construção plasmidial pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> foram confirmadas por sequenciamento de DNA e análise de similaridade. A imunogenicidade do BCGr pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> expressando o DTB foi investigada em camundongos BALB/c, os resultados obtidos revelaram uma soroconversão específica (IgG). A infectividade e atividade microbida do BCGr pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> no ambiente intracelular foi avaliada através da infecção de linhagens de células de monócitos humano (THP-1), os dados obtidos indicaram que houve sobrevivência intracelular em até 12 dias. Nesse contexto, esplenócitos dos camundongos imunizados com 30 e 60 dias foram extraídos, mostrando que o BCGr pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> persistiu até 60 dias na ausência de pressão seletiva e a viabilidade celular não sofreu alteração significativa durante o período testado. Por outro lado, o BCGr pUS977*dtb*<sub>PW8</sub>, quando submetido a seis sub-cultivos consecutivos *in vitro* não apresentou diferença significativa na capacidade de expressar o DTB, demonstrando portanto a persistência da estabilidade funcional da linhagem recombinante. A estabilidade estrutural da construção pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> também foi avaliada por PCR confirmando a presença do gene *dtb* em colônias do BCGr pUS977*dtb*<sub>PW8</sub>. Adicionalmente, foi possível avaliar preliminarmente *in vitro* a capacidade soroneutralizante dos soros de camundongos imunizados com BCGr pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> após 30 e 60 dias em células VERO. A ação citotóxica da toxina diftérica entre as diluições de 1/4 e 1/16 foram neutralizadas com o *pool* de soros imunes com 60 dias. Finalmente, em nosso estudo foi possível avaliar o potencial da vacina BCG como vetor de expressão de um antígeno de *Corynebacterium diphtheriae* *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Corynebacterium diphtheriae*. Difteria. Toxina diftérica. Fragmento B da toxina diftérica (*dtb*). *Mycobacterium bovis* BCG sub-cepa Moreau. BCG recombinante.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Dilzamar Veloso do. **Construction, cloning and expression of the fragment B of diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* (strain PW-8) in *Mycobacterium bovis* BCG Moreau sub-strain.** 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The diphtheria vaccine currently used in Brazil (DTP), despite its history of high efficacy in the prevention of diphtheria, is associated with episodes of toxicity and vaccine reactogenicity in the vaccinee, resulting from the presence in the vaccine of residual proteins derived from the production process or detoxification. Strategies for the development of new vaccines more effective and economically viable against diphtheria have been the subject of intense investigation. The alternative proposed by our group is the use of the vaccine against tuberculosis (*Mycobacterium bovis* BCG Moreau sub strain) as a vector for the gene that encodes the 58.3 kDa fragment B of the diphtheria toxin (DTB). In our project the *dtb* gene was cloned into the bifunctional vector pUS977 for cytoplasmic expression and recombinant BCG (rBCG) clones, selected after transformation of BCG, were tested for expression of the DTB polypeptide and antigenicity against polyclonal antibodies anti- diphtheria toxoid by immunoblotting. The integrity and identity of the DNA sequence encoding the *dtb* gene carried by the plasmid construct pUS977<sub>*dtb*PW8</sub> was confirmed by DNA Sequencing and Analysis of Similarity. The immunogenicity of the rBCG expressing the DTB was investigated in BALB/c mice and the results revealed a specific seroconversion (IgG). Also, infectivity and microbicidal activity were analyzed in the intracellular environment by infecting human monocytes (THP-1 cell line) with rBCG. The data obtained indicated intracellular survival within 12 days. In this context, splenocytes collected from mice at days 30 and 60 after immunization were removed and assayed for live bacteria. The results showed that rBCG persisted viable up to 60 days in the absence of selective pressure and cell viable counts did not change significantly during testing. Additionally, the rBCG subjected to six consecutive sub-cultures in vitro showed no significant difference in the ability to express the DTB, thus demonstrating the functional stability of the recombinant vaccine. The structural stability of the construct pUS977<sub>*dtb*PW8</sub> was also confirmed by PCR detection of the *dtb* gene in rBCG colonies. Also, it was possible to have a preliminary evaluation of the neutralizing capacity of sera from mice immunized with BCGr 30 and 60 days after immunization. The cytotoxic action of diphtheria toxin, between dilutions 1/ 4 and 1/16, was neutralized by mice sera in an in vitro assay using VERO cells. Finally, in our study it was possible to evaluate the potential of BCG as a vector for expression of an antigen of *Corynebacterium diphtheriae* in vitro and in vivo.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*. Diphtheria. Diphtheria toxin fragment B (DTB). *Mycobacterium bovis* BCG Moreau sub strain. Recombinant BCG.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Caso de difteria associado á Mononucleose.....	17
Figura 2 –	Estrutura Esquemática da Toxina Diftérica.....	30
Figura 3 –	Organograma das metodologias empregadas na primeira etapa deste estudo (Artigo 1).....	50
Figura 4 –	Organograma das metodologias empregadas na segunda etapa deste estudo (Artigo 2).....	51
Figura 5 –	Organograma das metodologias empregadas na terceira etapa deste estudo (Artigo 3).....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Diferentes tipos de vacinas contra difteria disponíveis no Brasil.....	35
Tabela 2 –	Alternativas existentes para novas vacinas contra a difteria.....	38
Tabela 3 –	Alguns genes de diferentes bactérias expressos em <i>M. bovis</i> (BCGr).....	41
Tabela 4 –	Alguns genes de diferentes vírus expressos em <i>M. bovis</i> (BCGr).....	43
Tabela 5 –	Alguns genes de diferentes protozoários expressos em <i>M. bovis</i> (BCGr).....	45
Tabela 6 –	Alguns genes de diferentes citocinas expressos em <i>M. bovis</i> (BCGr).....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	Bacilo de Calmette-Guérin (sub cepa Moreau)
<i>dtb</i>	Fragmento B da toxina diftérica (gene)
DTA	Fragmento A da toxina diftérica
DTB	Fragmento B da toxina diftérica (proteína)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida tipo 1
Middlebrook 7H9	Meio de cultivo líquido para micobacterias
Middlebrook 7H10	Meio de cultivo sólido para micobacterias
Pb	Par de base
PCR	Reação da polimerase em cadeia
pQE-30 <sup>TM</sup>	Plasmídeo Sistema de expressão procariótica (QIAexpress System)
pUS	Plasmídeo UFPel - Surrey (England)
p18 kDa	Peptídeo sinal de <i>Mycobacterium leprae</i>
PW 8	Cepa vacinal Park Williams 8
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida Desnaturante
THP-1	Células de monócitos humano
UFC	Unidade formadora de colônia
UNICEF	Fundo Internacional de Emergência das Nações Unidas para Crianças
UV	Luz ultravioleta
Vero	Linhagem celular derivadas de células epiteliais renais de macaco Verde Africano
$\alpha$ Hind III	Padrão de pares de DNA
$\Phi$ X174 RF DNA/Hae III	Padrão de pares de DNA

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	17
1.1	<b>Aspectos clínicos das infecções causadas pelo <i>Corynebacterium diphtheriae</i></b> .....	17
1.2	<b>Diagnóstico microbiológico</b> .....	20
1.3	<b>Aspectos epidemiológicos</b> .....	21
1.4	<b>Subnotificação de casos</b> .....	27
1.5	<b>Características fenotípicas e genotípicas do <i>Corynebacterium diphtheriae</i></b> .....	28
1.5.1	<u>Toxina diftérica</u> .....	29
1.5.2	<u>Imunidade e controle da difteria</u> .....	31
1.5.3	<u>Tipos de vacinas existentes para a difteria</u> .....	33
1.5.4	<u>Problemas relacionados com a vacina DTP e novas alternativas de vacina</u> .....	37
1.5.5	<u>Tecnologia de desenvolvimento de novas vacinas baseadas na modificação genética da vacina BCG (bacilo de Calmette e Guérin)</u> .....	38
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
2.1	<b>Geral</b> .....	49
2.2	<b>Específicos</b> .....	49
3	<b>RESULTADOS</b> .....	53
3.1	<b>Artigo 1: Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 <i>Corynebacterium diphtheriae</i> strain toxin</b> .....	54
3.2	<b>Artigo 2: Plasmid instability when the hsp60 gene promoter is used to express the protective non-toxic fragment B of the diphtheria toxin in recombinant BCG</b> .....	63
3.3	<b>Artigo 3: <i>Mycobacterium bovis</i> BCG as a delivery system for the <i>dtb</i> gene antigen from diphtheria toxin</b> .....	70
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	105
5	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	114
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	115

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	117
<b>ANEXO A</b> - Aprovação do Comitê de Ética.....	145
<b>ANEXO B</b> – Produção Científica Durante o Período de Realização do Doutorado.....	146

## INTRODUÇÃO

Infecções causadas pelo *C. diphtheriae* ainda são observadas em diferentes regiões do planeta, incluindo países onde os programas de vacinação são vigentes e que alcançam melhorias nas condições socioeconômicas. Diante de aspectos como a existência ainda de regiões endêmicas para a doença, o aumento das viagens internacionais, a emergência de clones epidêmicos ou invasores, a ocorrência de infecções atípicas associadas a cepas atoxinogênicas torna-se imprescindível a presença de uma vigilância epidemiológica adequada e permanente, com a implantação de esquemas acessíveis e confiáveis, que permitam a rápida triagem, isolamento e identificação do bacilo diftérico, principalmente de cepas toxinogênicas. Por outro lado, indivíduos imunizados também podem se apresentar como portadores assintomáticos desempenhando um papel importante na transmissão da difteria. Um percentual de 1 a 2% da população não responde a doses imunizantes do toxóide diftérico (Damasco *et al*, 2005). Isto ocorre em parte, por que a vacina atual tem efeito apenas neutralizante sobre a toxina e conseqüentemente, não previne a colonização e infecção pelo bacilo diftérico. O toxoide diftérico ainda é à base de vacinas atuais contra a difteria. Entretanto, a resposta imune de memória para a vacina DTP são instáveis e atenuadas (Upham *et al*, 2006).

A busca por uma vacina anti-diftérica não associada com reatogenicidade, e ao mesmo tempo mais segura e eficaz é uma necessidade mundial. Algumas das alternativas existentes para reduzir a reatogenicidade da vacina atual incluem a purificação completa do toxóide, a utilização de antígenos como o CRM 197 (*Cross Reacting Material*) ou a toxina diftérica detoxificada geneticamente, entre outros. Todas essas opções envolvem um aumento considerável do custo final uma vez que requerem etapas de purificação que oneram sobremaneira o processo. Outra importante alternativa para uma versão melhorada da vacina atual é o uso de vetores bacterianos vivos atenuados capazes de expressar antígenos definidos e protetores *in vivo* (sistemas de liberação de antígenos).

Essa última opção tem recebido investimento continuado de vários grupos envolvidos com desenvolvimento ou melhoramento de vacinas e preconiza o uso de uma vacina viva como o *M. bovis*, cepa BCG, utilizada mundialmente contra a tuberculose como vetor de genes heterólogos “protetores”. A vacina BCG também



possui propriedades adjuvantes intrínsecas e induz uma vigorosa resposta IFN- $\gamma$  em crianças. Essa estratégia requer a modificação genética do BCG, e o seu uso como vetor da sequência de DNA codificadora de um antígeno alvo da resposta imune como o fragmento B da toxina diftérica, responsável pela adesão celular e internalização da toxina. A nossa hipótese é que se construirmos uma vacina que induza uma resposta contra o fragmento B da toxina estaremos, na verdade, impedindo a adesão e internalização da toxina através da geração de uma resposta neutralizante e, conseqüentemente, teremos uma vacina eficaz e mais segura.

O presente estudo teve como objetivo geral a construção e avaliação preliminar de uma nova cepa de BCG obtida através da transformação do *M. bovis* BCG (sub-cepa Moreau) com um sistema plasmidial para a expressão intracelular da sequência de DNA que codifica o fragmento B da toxina diftérica, originada da cepa vacinal do *C. diphtheriae*, Park-Williams 8. Neste sentido, os objetivos específicos relacionados com as hipóteses de trabalho foram desenvolvidos, como a seguir:

- a) Amplificação por PCR da sequência de DNA codificadora do DTB, clonagem em vetor plasmidial, expressão em *E. coli* e purificação do DTB recombinante (DTBr<sub>pw8</sub>);
- b) Análise do perfil eletroforético do DTBr<sub>pw8</sub> em gel de SDS-PAGE e da antigenicidade através da técnica de *Immunoblotting*; contra soro anti-toxóide diftérico;
- c) Avaliação da capacidade da proteína DTBr<sub>pw8</sub> de induzir uma resposta humoral anti-toxóide diftérico em camundongos BALB/c e coelhos New Zealand;
- d) Ensaio de neutralização dermonecrotica em coelhos New Zealand;
- e) Clonagem da sequência de DNA codificadora do gene *dtb* no vetor plasmidial bifuncional pUS977 para expressão intra-citoplasmática;
- f) Transformação do *M. bovis* (BCG sub cepa Moreau) com a construção pUS977<sub>dtb<sub>pw8</sub></sub>; análise do perfil eletroforético (SDS-PAGE) e da antigenicidade (*Immunoblotting*) de lisados do BCGr pUS977<sub>dtb<sub>pw8</sub></sub> contra soro anti-toxóide diftérico;
- g) Avaliação *in vitro* e *in vivo* da estabilidade estrutural e funcional do BCGr pUS977<sub>dtb<sub>pw8</sub></sub>;
- h) Avaliação da capacidade do BCGr pUS977<sub>dtb<sub>pw8</sub></sub> de induzir uma resposta humoral anti-toxóide diftérico em camundongos BALB/c;

- i) Avaliação da capacidade de infecção e persistência intracelular do BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> em monócitos humanos da linhagem THP-1;
- j) Avaliação da persistência intracelular do BCGr em esplenócitos de camundongos imunizados com o BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub>;
- k) Avaliação da capacidade do BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> de induzir anticorpos neutralizantes (soro-neutralização da toxina diftérica em células Vero).

Os próximos capítulos constituem o corpo deste trabalho.

## 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A difteria é uma doença bacteriana toxêmica de evolução aguda que permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, inclusive em países em que foram implantados programas de imunização infantil (Galazka, 2000; Khan *et al*, 2007; Adler & Mahony, 2013). Apesar dos relevantes conhecimentos adquiridos durante os anos em diferentes áreas (microbiologia, patologia, medicina interna e preventiva), estratégias disponíveis para erradicá-la ainda são insuficientes, uma vez que a eficácia da vacina, anatoxina diftérica (dT ou DT) é em torno de 60% (Milstien, 2005). É necessária maior integração entre as áreas de prevenção, controle e a rede assistencial visando melhorias no diagnóstico, tratamento, prevenção da doença e a consequente interrupção da cadeia de transmissão (Ministério da Saúde, 1980-2005; Byard, 2013).

### 1.1 Aspectos clínicos das infecções causadas pelo *Corynebacterium diphtheriae*

A difteria clássica é causada por cepas toxigênicas de *C. diphtheriae* e acomete principalmente crianças na idade pré-escolar, quando não adequadamente imunizadas, culminando em quadro toxi-infeccioso agudo, muitas vezes fatal (Mortimer Jr & Wharton, 2004; Adler & Mahony, 2013). Os principais sintomas clínicos locais e sistêmicos da doença decorrentes da ação potente da toxina diftérica (Pappenheimer, 1993; Wang & London, 2009; Man *et al*, 2010) incluem: cansaço, prostração, febre baixa, dor de garganta, inflamação local nas amígdalas, faringe, laringe e nariz com sufocamento relacionado diretamente com irritação no local e o aparecimento de pseudomembrana de coloração acinzentada na garganta, podendo se estender para a boca ou trato respiratório inferior nos quadros de difteria maligna (Kadirova *et al*, 2000). Os sintomas mais graves incluem: alteração na visão, na deglutição, na movimentação de braços e pernas, que podem deixar sequelas ou causar a morte do indivíduo. O coração, o pulmão, o sistema nervoso central e os

músculos estriados esqueléticos são os principais alvos, podendo também ocorrer comprometimento renal (Hadfield *et al*, 2000; Varghese *et al*, 2013).

O *C. diphtheriae* também pode ser encontrado com relativa frequência em lesões cutâneas diversas e em sítios incomuns, como ouvidos, conjuntiva e vagina, particularmente em regiões tropicais (Coyle & Tompkins, 1980; Formiga *et al*, 1982). A colonização de indivíduos adultos é de grande interesse, pois o microrganismo já foi isolado de espermocultura, úlceras leishmanióticas e de indivíduos portadores de neoplasias (Formiga, 1986; Formiga & Mattos-Guaraldi, 1993; Formiga & Mattos-Guaraldi, 2001; Berger *et al*, 2013).

A transmissão do *C. diphtheriae* se faz pelo contato direto com doentes ou portadores assintomáticos através das secreções de rinofaringe, perdigotos espalhados por tosse, espirros ou pela fala. A transmissão indireta, através de objetos, também pode ocorrer, embora menos frequentemente. Os portadores de difteria cutânea parecem ser mais infectantes que os portadores nasais ou faríngeos. Desta forma, estes portadores e as infecções subclínicas são as fontes mais importantes para a transmissão do patógeno. O período de incubação em geral é de 1 a 6 dias, podendo ser mais longo. A transmissibilidade em média ocorre em até duas semanas após o início da doença.

A antibioticoterapia adequada erradica o bacilo diftérico da orofaringe, 24 – 48 horas após a sua introdução na maioria dos casos. O portador assintomático é extremamente importante na disseminação da difteria uma vez que pode eliminar o microrganismo por aproximadamente seis meses ([http://www.saude.gov.br/vigilância epidemiológica de doenças transmissíveis](http://www.saude.gov.br/vigilância_epidemiológica_de_doenças_transmissíveis)).

Cepas atoxigênicas de *C. diphtheriae* têm sido relacionadas com quadros de infecções invasivas, incluindo endocardite, artrite e osteomielite (Mattos-Guaraldi *et al*, 2003) em diversos países como França (Lortholary *et al*, 1993), Suíça (Gubler *et al*, 1998), Inglaterra (Efstratiou *et al*, 1996; Efstratiou *et al*, 1993; Reacher *et al*, 2000), Canadá (Romney *et al*, 2006) e Brasil (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998). Um único clone da bactéria causadora da doença invasiva foi isolado entre usuários de drogas na Suíça (Gubler *et al*, 1998). Cepas atoxigênicas das subespécies *gravis*, *mitis* e *belfanti* podem causar doenças invasivas fatais inclusive em pacientes sem história prévia de doença cardíaca, provavelmente por exibirem predileção pelo tecido endotelial valvar cardíaco e sinovial íntegro. O patógeno também se mostrou capaz de colonizar pacientes internados e persistir no ambiente hospitalar (Mattos-

Guaraldi *et al*, 2001; Gomes *et al*, 2009). O *C. diphtheriae* foi relacionado com quadro de infecção percutânea causada por cateter de nefrostomia em paciente portador de neoplasia. Os dados sugeriram a habilidade do bacilo da difteria aderir a dispositivos invasivos para causar infecções em hospedeiros suscetíveis. Estudos posteriores realizados *in vitro* demonstraram a habilidade de *C. diphtheriae* formar biofilme em superfícies abióticas e hidrofóbicas. Os mecanismos pelos quais a colonização bacteriana de cateteres ocorre não são totalmente esclarecidos. Estudos adicionais foram necessários para investigar as propriedades do *C. diphtheriae* quando ao depósito de fibrina e adesão a vários substratos utilizados na formação de biofilme (Gomes *et al*, 2009). Mattos-Guaraldi e colaboradores, (2011) relataram caso de membrana infecciosa localizada na faringe coincidente com *C. diphtheriae* associada com mononucleose infecciosa, em menor de 11 anos com esquema de vacinação incompleta (Figura 1). Semelhante a este acaso, apenas dois casos de difteria concorrentes e IM foram descritos na literatura médica (Perkins *et al*, 2010). A patogenicidade da infecção invasiva causada pelo *C. diphtheriae* atoxinogênico ainda não foi completamente esclarecida. A maioria dos casos ocorre em indivíduos adultos e previamente imunizados, sendo, portanto, importante identificar bacilos gram-positivos irregulares isolados de sítios estéreis.

Figura 1 - Caso clínico com associação de difteria e mononucleose infecciosa ocorrido em criança do sexo masculino, 11 anos de idade e parcialmente imunizada



Nota: Presença de pseudomembrana aderente na amígdala direita, com coloração branco-acinzentado.

Fonte: Adaptado de Mattos-Guaraldi *et al*, 2011.

## 1.2 Diagnóstico microbiológico

A difteria é uma patologia em que a precocidade do diagnóstico é de grande valor, por estar seu prognóstico intimamente ligado ao tempo decorrente entre o início do quadro clínico e a administração da terapêutica específica. Para o diagnóstico preciso é necessário o isolamento do *C. diphtheriae* através da cultura e a demonstração de sua toxigenicidade (Formiga & Mattos-Guaraldi, 1993; Macambira, Formiga & Formiga, 1994; Efstratiou *et al*, 1998). Em diversos esquemas de identificação do bacilo diftérico, a fermentação de sacarose é considerada uma prova chave, (Cardénas *et al*, 1972; Formiga, 1986). Aproximadamente, 75% das amostras isoladas no Rio de Janeiro, durante a década de 80, fermentavam a sacarose (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991). Este evento foi observado em amostras isoladas de diferentes regiões do território brasileiro incluindo os estados do Paraná, Pernambuco e Rio de Janeiro (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998; Pereira, 2001). Ao contrário das amostras oriundas do trato respiratório superior, o biotipo não fermentador de sacarose foi predominantemente encontrado entre as cepas isoladas de pele, incluindo as de úlceras leishmanióticas (Formiga, 1986).

O teste de Elek permanece como método convencional utilizado em vários laboratórios em todo o mundo, entretanto pode fornecer resultados pouco confiáveis. Os programas de controle de qualidade desenvolvidos em 1982 e 2000, em laboratórios europeus, demonstraram que em apenas 69% e 88% das oportunidades, respectivamente, foram observados resultados corretos nos testes de toxigenicidade (incluindo Elek e PCR) (Snell *et al*, 1984; Engler *et al*, 2001). O teste de imunodifusão radial simples (IDR) tem sido utilizado nos laboratórios de Saúde Pública no Brasil desde a década de 80 uma vez que se apresentou como um método simples e tão eficaz quanto o método de Elek, além de permitir a detecção de amostras fracamente produtoras de toxina (Formiga, 1986). Outros métodos têm sido utilizados na detecção de produção da toxina, incluindo os testes de hemaglutinação passiva reversa, ELISA, aglutinação passiva reversa em látex, imunocromatografia – ICS e modificações do Elek (Engler *et al*, 2001). O sistema API Coryne tem se mostrado bastante eficiente na identificação de microrganismos

do gênero *Corynebacterium* (Zapardiel *et al*, 1994), incluindo espécies potencialmente produtoras de toxina como o *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (Sing *et al*, 2005), este sistema manual miniaturizado disponível comercialmente a partir da década de 90, tem sido utilizado por diversos investigadores como método alternativo de diagnóstico de microrganismos corineformes isolados de espécimes clínicos humanos. Segundo alguns pesquisadores, a realização de testes bioquímicos adicionais foi necessária para a identificação definitiva em 32% das oportunidades. As constantes modificações taxonômicas impossibilitam que as novas espécies de corinebactérias sejam identificadas pelo sistema (Zapardiel *et al*, 1994; Clarridge & Sprigel, 1995; Funke *et al*, 1996; Gubler *et al*, 1998; Zasada *et al*, 2005).

No sentido de facilitar a identificação pelos laboratórios de bacteriologia clínica em regiões de condições socioeconômicas desfavoráveis tem sido desenvolvidos testes alternativos de triagem do microrganismo, incluindo o teste da DNase (Pimenta *et al*, 2008). Por outro lado, diferentes métodos moleculares também foram desenvolvidos visando atender laboratórios que apresentem infraestruturas adequadas em diversos níveis. Como exemplo, podemos destacar a técnica de Multiplex PCR (Pimenta *et al*, 2008); PCR-dtxR, ensaio espécie-específico na detecção de cepas toxinogênicas e atoxinogênicas (Pimenta *et al*, 2008), RT PCR (Mothershed *et al*, 2002; Schuhegger *et al*, 2008) e ensaio multiplex (m-PCR) para a detecção de espécies potencialmente produtoras de toxina diftérica (Torres *et al*, 2013).

### 1.3 Aspectos epidemiológicos

A partir dos anos 80, vários países passaram por um progresso no controle da difteria. A taxa de incidência atingiu níveis tão baixos que gerou na comunidade científica uma inocente expectativa de erradicação da doença na Europa até o final do ano de 2000 (Galazka, 2000; Wagner *et al*, 2012), Apesar de todos os esforços no controle da difteria, no final do século XX, registrou-se uma epidemia com mais de 150.000 casos e 5.000 óbitos na antiga União Soviética/Leste Europeu que se estendeu rapidamente a 15 nações independentes, a alguns países da Europa Ocidental (Finlândia, Alemanha, Noruega e Polônia) e a Ásia (Mongólia), (Serwold-

Davis & Groman, 1986; Halioua *et al*, 1992). Durante os anos 1990, a OMS recomendou a instauração de uma equipe composta de profissionais de laboratório, médicos clínicos e epidemiologistas (ELWGD/DIPNET) de diversos países com o intuito de controlar a maior epidemia de difteria ocorrida nos últimos tempos através da vigilância dos casos, diagnóstico e pronto-tratamento, além do procedimento de vacinação de adultos e crianças (Schiller *et al*, 1983; Dittman, 2000; Von Hunolstein *et al*, 2003; Begg, 2008). Naquela oportunidade os pesquisadores alertaram para a possibilidade de uma pandemia (Galazka, 2000). Uma nova característica da última epidemia no século XX, na Europa Oriental, foi o elevado número de casos entre adolescentes e adultos. Diferente de outras epidemias, esta se desenvolveu em área urbana, com rápida extensão para as regiões rurais (Pappenheimer, 1993). Sob o ponto de vista da assistência a população doente, poucos médicos apresentavam experiência em diagnóstico e tratamento de difteria. A partir de um estudo realizado em São Petersburgo, pode-se atestar que, de 1.860 casos de difteria em adultos, a presença de pseudomembrana diftérica foi registrada somente em 32,5% deste conjunto de casos. A forma clínica mais comum (67,5%) foi classificada como catarral: inflamação nas tonsilas e/ou faringe sem membrana ou hemorragia (Rakhmanova *et al*, 1996). Podemos considerar que estas apresentações atípicas, no início desta epidemia, também possam ter contribuído para a falta do diagnóstico clínico imediato dos casos índices de infecções por *C. diphtheriae*. Tanto nos países industrializados (Wang & London, 2009) quanto nos em desenvolvimento tem sido observado deslocamento da faixa etária em diversos casos de difteria. Na epidemia da República do Kurgistão (1994-1998), 70% dos pacientes hospitalizados estavam na faixa etária acima de 15 anos de idade; no grupo de 0 a 19 anos, 68% tinham recebido pelo menos três doses do toxóide diftérico enquanto 52% das pessoas com mais de 20 anos não haviam recebido nenhuma dose desde 1990; 40%, 6% e 3% tinham recebido uma, duas e três ou mais doses, respectivamente desde 1990. A média de idade dos pacientes que morreram foi de 12 anos (3-53 anos); 42% dos casos fatais foram acima de 15 anos. Entre os pacientes adultos com difteria houve um predomínio do sexo feminino. A respeito das características clínicas da difteria foi predominantemente observado a ausência de pseudomembrana e de acometimento da laringe em pacientes hospitalizados (Kadirova *et al*, 2000). De acordo com os dados disponibilizados pela OMS (Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597869\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597869_eng.pdf). Acesso em: 22



de janeiro de 2011). Dentre outros países que vivenciaram epidemias de difteria nas últimas décadas (1980-2010) podemos ressaltar: Índia (283.166 casos), Paquistão (48.679 casos), China (39.913 casos), Nigéria (33.826 casos), Indonésia (31.759 casos), Vietnã (24.151 casos), Filipinas (20.101 casos), Bangladesh (17.315 casos), Afeganistão (16.165 casos), Iraque (11.324 casos), Lemen (10.323 casos), Madagascar (10.173 casos), Tailândia (8.692 casos), Sudão (8.207 casos), Quênia (6.437 casos), Cambodia (6.248 casos), Egito (5.451 casos), Mianmar (5.392 casos), Irã (3.716 casos) e Etiópia (2.832 casos). Do total de 836.860 casos notificados mundialmente no período de 1980-2010, a difteria também permaneceu sendo causa de morbidade e mortalidade no continente americano. Casos de difteria ocorreram em diversos países, tanto da América Latina (37.036 casos) quanto da América do Norte (206 casos): Brasil (28.056 casos), Chile (1.771 casos), República Dominicana (1.614 casos), Peru (1.343 casos), Equador (1.088 casos), Colômbia (1.030 casos), Haiti (879 casos), Argentina (347 casos), Bolívia (301 casos), Venezuela (268 casos), Canadá (151 casos), Jamaica (97 casos), Guatemala (92 casos), México (80 casos), El Salvador (70 casos) e Estados Unidos (55 casos). Nos anos (2009/2010) foram reportados 6.900 casos de difteria nos seguintes países: Índia (5.118 casos), Indonésia (574 casos), Nepal (423 casos), Irã (164), Filipinas (118 casos), Tailândia (77 casos), Gana (47 casos), Haiti (37 casos), Paquistão (71 casos), Bangladesh (50 casos), Brasil (36 casos), Laos (34 casos), Mianmar (23 casos), Federação Russa (23 casos), Iraque (15 casos), Vietnã (14 casos), Alemanha (12 casos), Letônia (08 casos), Eritrea (07 casos), Turcomenistão (07 casos), Lemen (07 casos), Cambodia (06 casos), Maurício (05 casos), Sudão (05 casos), Bielorrússia (04 casos), República Dominicana (05 casos), Geórgia (04 casos), Malásia (03 casos), África do Sul (01 caso), Armênia (01 caso) e Moldávia (01 caso). Os dados apresentados pela OMS relativos à mortalidade e incidência de difteria relacionaram as seguintes regiões com maiores índices DALYs (Disability-Adjusted Life Year): América Central [Haiti (>50 DALYs) e República Dominicana], África Sub-saariana [República Democrática do Congo, Serra Leoa e Ásia [Nepal e Mianmar] (>15 DALYs) (Wang & London, 2009). Vale lembrar que cada unidade DALY representa um ano de vida saudável perdido, seja por doença, internação ou mesmo óbito (levando em conta a expectativa de vida de cada país) a cada 100.000 habitantes. Estes dados indicam o quanto a difteria permanece sendo uma doença infecciosa de elevada taxa de morbi-letalidade, além do alto potencial epidêmico e

pandêmico (Pappenheimer, 1977; Popovic *et al*, 1995; Sadoh & Oladokun, 2012). Mesmo com a visível evolução na Saúde Pública mundial ainda existem muitos relatos de casos de difteria nos diferentes continentes decorrentes da falta de vacinação ou por ignorância dos benefícios por ela adquiridos. Como exemplo, podemos citar a Índia (>7 DALYs) onde a difteria permanece em proporções epidêmicas, país este em que a cobertura vacinal é inferior a 80% e apenas 56% das crianças apresentam proteção contra a difteria ( $\geq 0,1$ UI/ml) (Yamaizumi *et al*, 1978; Mekada *et al*, 1988; Chang *et al*, 1989). Apenas no período entre 1990 a 1997, foram notificados 56.000 casos com uma taxa de mortalidade de 6%. Aproximadamente 80% dos casos ocorreram em crianças entre 1 e 9 anos de idade. A maioria dos casos de difteria (>65%) ocorreu em indivíduos não imunizados (Mekada *et al*, 1988) e um elevado percentual (32%) de casos fatais ocorreu em crianças menores de 10 anos de idade não vacinadas ou parcialmente imunizadas (Singh *et al*, 1999). Em um hospital de Calcutá, Índia, 12,1% dos casos foram fatais. Em entrevista com pacientes e/ou membros da família, 84/107 pacientes foram considerados não imunizados e a maioria dos respondentes não tinha nenhuma ideia a respeito da modalidade, da propagação da doença ou conhecimento correto sobre o benefício da vacina DTP. A razão principal (44%) para a não imunização foi à falta de informação (Galazka, 2000), a semelhança do ocorrido em Karachi, Paquistão, onde apenas 25,2% das mães tinham conhecimento sobre os benefícios da imunização para difteria (Galazka, 2000). No ano de 2009, ocorreu em Assam um surto de difteria em adultos (em média com idade de 21 anos) com taxa de mortalidade de 30,8%. Os pacientes não foram submetidos à soroterapia devido à indisponibilidade de SAD (Galazka, 2000). Diferente do observado no Leste Europeu em que as cepas epidêmicas eram predominantemente da variedade *gravis*, na epidemia da Índia foi isolado principalmente *C. diphtheriae* var. *intermedius* (Mekada *et al*, 1988). Entretanto, também foi documentada a persistência de cepas atoxinogênicas de *C. diphtheriae* var. *gravis* em Puducherry, no sul da Índia (Khan *et al*, 2007). Dentre os principais fatores predisponentes para o estabelecimento de infecções pelo *C. diphtheriae* encontram-se as condições socioeconômicas e higiênicas inadequadas e o estado de imunocomprometimento (Patey *et al*, 1997; Funke *et al*, 1999), além da recusa, por parte da população, aos procedimentos de imunização ([http://www.saude.gov.br/vigilância epidemiológica de doenças transmissíveis](http://www.saude.gov.br/vigilância_epidemiológica_de_doenças_transmissíveis)). Em países industrializados, uma maior incidência de infecções

invasivas, causadas principalmente por amostras atoxinogênicas, como: sepse, endocardite, aneurisma micótico cerebral, abscesso esplênico e osteomielite foram observados em subgrupos populacionais de homossexuais, mendigos, usuários de drogas, alcoólatras, prisioneiros além de comunidades de religiosos ortodoxos ou de aborígenes (Pappenheimer, 1993; Funke *et al*, 1997; Galazka, 2000). No Brasil, a história natural da difteria vem sendo modificada em decorrência da imunização em massa e da melhoria da qualidade de vida da população (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998; Riegel, 1998). Desde a década de 1990, a cobertura vacinal para difteria manteve-se em taxas progressivamente satisfatórias, tendo alcançado 99% da população infantil (Riegel, 1998). No entanto, a difteria ainda permanece incidindo de forma endêmica além de ocorrerem surtos epidêmicos, indicando, deste modo, falhas na cobertura vacinal em algumas regiões geográficas. Casos de difteria ocorreram na maioria dos estados brasileiros (Huber-Schneider *et al*, 1994; Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998; Funke *et al*, 1999; Hirata *et al*, 2008). Os quadros de difteria clássica tem sido relacionados predominantemente com amostras de *C. diphtheriae* var. *mitis* pertencentes aos biótipos fermentador e não fermentador de sacarose apesar de também serem observados casos de difteria por amostras de *C. diphtheriae* var. *gravis* e *C. diphtheriae* var. *intermedius*. Em 2010, em três municípios do Estado do Maranhão, onde a cobertura vacinal infantil chega a 56%, foram confirmados 27 casos de difteria clássica (2 óbitos) com presença de pseudomembrana relacionados com amostras de *C. diphtheriae* var. *intermedius*. Os casos ocorreram predominantemente em crianças entre 3 e 6 anos de idade com histórico de vacinação completa. Como na Índia (Galazka, 2000), os pacientes também não foram submetidos a soroterapia (Huber-Schneider, 1994). A taxa de letalidade tem sido variável desde 1980 e já chegou a alcançar 22% em algumas regiões. O aumento da mortalidade nos últimos anos pode estar relacionado à diminuição do número de casos, diagnóstico tardio, deficiência na assistência e ao acesso aos serviços de saúde (Mishra *et al*, 2005). Na Índia, onde a taxa de mortalidade tem alcançado proporções superiores a 30%, os pesquisadores estão procurando alertar os profissionais de saúde para a possibilidade de crianças que apresentarem dor de garganta e algum sinal de toxemia estarem com difteria e necessitarem de terapia específica com internação (Huber-Schneider *et al*, 1994; De Zoysa *et al*, 1995). Os diversos estudos realizados no Rio de Janeiro demonstraram a possibilidade de ocorrer difteria clássica também em indivíduos adultos vacinados

(Damasco *et al*, 2005). A espécie *C. diphtheriae* permanece circulando em nosso ambiente causando, além da difteria clássica, infecções sistêmicas e/ou atípicas. (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998); Mattos-Guaraldi *et al*, 2001; Mattos-Guaraldi *et al*, 2003).

Diferente do observado em alguns países em que infecções invasivas foram relacionadas com um único clone (Golaz *et al*, 2000), no Brasil quadros de infecções invasivas já foram relacionados com amostras de *C. diphtheriae* var. *gravis*, *mitis*, *belfanti* e/ou amostras pertencentes aos biótipos fermentador e não fermentador de sacarose. No Rio de Janeiro, amostras de *C. diphtheriae* var. *mitis*, do biótipo fermentador de sacarose, assim como de amostras de *C. diphtheriae* var. *gravis*, foram isoladas de casos de endocardite em crianças e adultos em diferentes unidades nosocomiais (Hirata *et al*, 2008). *C. diphtheriae* atoxinogênico também foi relacionado a quadros de infecção pulmonar e de sítio de inserção de catéter no ambiente hospitalar em pacientes idosos e/ou portadores de neoplasias (Mattos-Guaraldi *et al*, 2001; Gomes *et al*, 2009). Um caso de co-infecção pelo *C. diphtheriae* e o vírus da mononucleose infecciosa em criança de 11 anos de idade apresentando histórico de vacinação incompleta para difteria. Em contraste ao observado para a antibioticoterapia, o desaparecimento da pseudomembrana só ocorreu após o tratamento com SAD (Mattos-Guaraldi *et al*, 2011). Os dados permitem aventar a hipótese de que a escassez de dados epidemiológicos relativos às infecções invasivas em nosso país possa estar relacionada ao fato de os clínicos e os microbiologistas não estarem atentos para a possibilidade de infecção atípica sem formação de pseudomembrana e/ou de infecção invasiva causada por *C. diphtheriae* atoxinogênico ou toxinogênico nas demais regiões do país. No Brasil foi descrito um caso de infecção fatal em humanos causada por *C. ulcerans* (Mattos-Guaraldi *et al*, 2008) e posteriormente outro caso onde foi detectada a condição de portador assintomático de um cão, ambos na área metropolitana da cidade do Rio de Janeiro (Dias *et al*, 2010). Uma vez que foi demonstrada a presença de *C. ulcerans* infectando humanos e colonizando cães em nosso ambiente (Mattos-Guaraldi *et al*, 2008; Dias *et al*, 2010), a escassez de dados epidemiológicos em outras regiões do país pode estar relacionada ao fato dos clínicos e os microbiologistas não estarem atentos para a possibilidade de infecção zoonótica em nosso ambiente, aliado ao desconhecimento de aspectos clínicos e microbiológicos de processos infecciosos causados pelo *C. ulcerans* e ausência de procedimentos

de rotina que permitam o isolamento e identificação do patógeno nos laboratórios clínicos. Interessantemente, sendo o Brasil um país de extensão continental, também não termos encontrado descrito na literatura um único caso de infecção pelo *C. ulcerans* em animais de fazenda.

#### 1.4 Subnotificação de casos

Assim como em outros países em desenvolvimento, no Brasil não se pode descartar a possibilidade de subnotificação de casos em decorrência da falta de esclarecimento da população para a busca de atendimento médico e das dificuldades de obtenção do diagnóstico clínico-laboratorial em casos de difteria, particularmente quando os pacientes estão parcialmente protegidos contra a ação da TD.

A análise dos dados da OMS permite ainda observar uma interrupção abrupta no número de casos ou a ausência de casos ao longo de anos em diversos países em desenvolvimento em países onde a cobertura vacinal ainda permanece em níveis insatisfatórios, inclusive na América Latina. As dificuldades apresentadas pelos clínicos e microbiologistas para realizar o diagnóstico definitivo de difteria, a vasta extensão territorial aliada à heterogeneidade das condições socioeconômicas e carência de disponibilidade de redes de laboratórios habilitados para o isolamento e identificação dos patógenos estão incluídos entre os fatores que podem dificultar a notificação de casos nos diversos países do continente Africano, Asiático e Sul-Americano. A subnotificação de casos oferece dificuldades para que seja feita a estimativa correta da morbidade e mortalidade pela difteria nessas regiões do globo. Portanto, o número de casos de difteria no mundo é maior do que os dados que puderam ser divulgados pela OMS e pela literatura disponível.

**a. Características fenotípicas e genotípicas do *Corynebacterium diphtheriae***

O gênero *Corynebacterium* apresenta morfologia celular pleomórfica, como cocobacilos e/ou bacilos retos ou ligeiramente curvos, com dilatações irregulares em uma das extremidades (forma em clava, em pêra, ou em fuso), agrupados paralelamente (em paliçada), ou formando ângulos retos uns aos outros (formas em V, H e Y) o que lhes dá, em conjunto, a aparência de letras chinesas decorrentes da separação incompleta da célula durante a divisão celular. Na maioria das oportunidades, quando recém-isolados ou cultivados nos meios de Loeffler ou de PAI, as células bacterianas apresentam grânulos intracitoplasmáticos de reserva de polimetáfosfatos, denominados corpúsculos de *Babes-Ernst*, que se coram metacromaticamente (Shively, 2006). Os procedimentos de isolamento e cultivo também incluem o meio seletivo contendo telurito de potássio (Meio de Tinsdale ou o meio ágar chocolate telurito) (Funke & Bernard, 2007).

A espécie *C. diphtheriae* compreende bacilos gram-positivos capazes de produzir toxina diftérica quando infectados por bacteriófagos  $\beta$  que apresentam o gene *tox*. Estudos moleculares demonstraram diversidade genética entre as amostras de *C. diphtheriae* que circulam no Brasil e no mundo, assim como a existência de clones epidêmicos e também de clones invasores (Popovic *et al*, 1996; Popovic *et al*, 2000; Pereira, 2001; Mattos-Guaraldi *et al*, 2003). Um marco milenar nos estudos da genética do *C. diphtheriae*, foi a avaliação minuciosa da seqüência genômica completa de um isolado clínico, biótipo *gravis* cepa NCTC 13129 (Cerdeño-Tarraga *et al*, 2003), responsável pela epidemia no Leste Europeu na década de 90 (Popovic *et al*, 1996; Popovic *et al*, 2000). A subsequente anotação da seqüência genômica proporcionou a evidência da presença de alguns genes que codificam para ilhas de patogenicidade e que podem também ser considerados como um pré-requisito para o detalhamento de análises pós-genômicas desta bactéria. Hansmeier e colaboradores em 2006 realizaram o primeiro estudo sistemático através de frações do proteoma da superfície celular e extracelular da cepa de *C. diphtheriae* C7<sub>s</sub>(-)<sup>tox-</sup> amplamente utilizada nos laboratórios de pesquisa. Algumas das proteínas identificadas codificam para ilhas de patogenicidade, outras proteínas ligadas ao transporte de ferro (HmuT, Trp6A, CiuA e FrgD). A proteína

denominada de FrgD, foi descrita como predominante na superfície celular bacteriana, porém, sua função biológica permanece desconhecida (Hansmeier *et al*, 2006).

### 1.5.1 Toxina diftérica

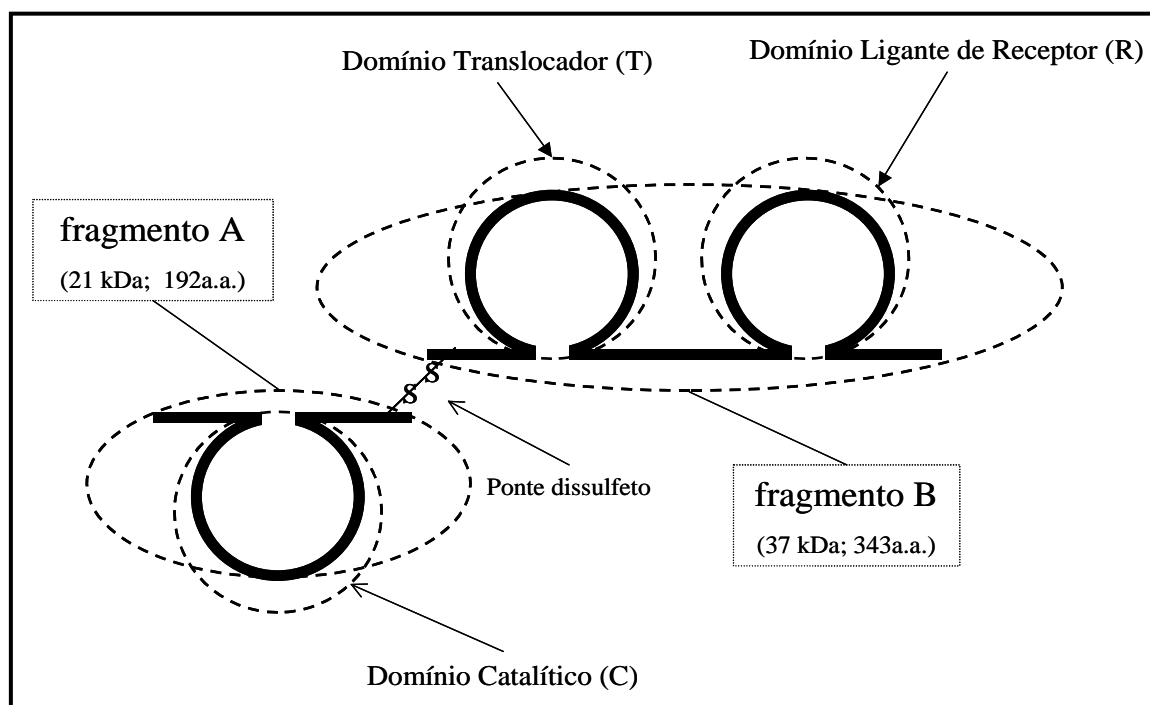
A toxina diftérica (DT) foi cristalizada como um monômero e a estrutura de raio X determinada para 2.3 Å de resolução (Bennett & Eisenberg, 1994), é liberada extracelularmente como uma cadeia polipeptídica simples. O polipeptídeo é composto de 535 aminoácidos e três domínios estruturais/funcionais claramente definidos: o domínio catalítico-C amino-terminal, responsável pela ADP-ribosilação do fator de alongamento de cadeia (EF-2), denominado de fragmento A (DTA). O fragmento A ocorre com a redução das pontes dissulfídicas, possui 21 kDa e compreende os aminoácidos de 1 a 192, responsável pela ação tóxica da molécula. O domínio T translocador está localizado centralmente, corresponde ao fragmento B (DTB) possui 37 kDa e representa os aminoácidos de 193 a 535 (Pappenheimer, 1977; Greenfield *et al*, 1983). Também é responsável pela inserção na membrana em pH ácido, formação de canais e translocação do domínio C pelas membranas endossomais para liberação no citosol e ligante de receptor (R, porção C-terminal), 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). A interação da toxina com a célula alvo é realizada através da ligação do domínio R com um receptor específico de células de mamíferos, denominado precursor do fator de crescimento epidérmico ligante de heparina (heparin-binding epidermal growth factor; HB-EGF).

A diferença na susceptibilidade entre diferentes espécies animais e entre tipos celulares pode ser explicada pela presença desse receptor em maior ou menor quantidade e por sua variabilidade genética (Uchida & Yoneda, 1967; Smith *et al*, 1980; Chellapandi *et al*, 2013).

A toxina diftérica é a mais bem estudada das toxinas bacterianas e o principal fator de virulência do *C. diphtheriae*, servindo assim como um modelo para estudar sua entrada no citoplasma de células eucarióticas ou para o transporte de moléculas

ativas biologicamente para o citosol (Wang & London, 2009; Man *et al*, 2010; Ladokhin, 2013). As investigações continuam a produzir novas perspectivas dentro da estrutura e função, bem como, a interação com células hospedeiras. A TD apresenta uma dose letal mínima menor que 0,1 mg Kg de peso corporal, sendo extremamente potente (Pappenheimer, 1993). A produção do bacilo diftérico sintetiza a exotoxina de natureza protéica, a qual atua em todos os tecidos e possui especial tropismo para o miocárdio, sistema nervoso, rins e supra-renais (Macambira *et al*, 1994; Hadfield *et al*, 2000). Nos últimos anos, várias imunotoxinas baseadas nas propriedades biológicas da toxina diftérica (Ma *et al*, 2013), foram desenvolvidas para o tratamento de doenças como psoríase (Gotlieb *et al*, 1995), infecção pelo vírus HIV (Finberg *et al*, 1991; Zhang *et al*, 1997; Martin-Serrano *et al*, 1998; Falnes *et al*, 2001; Brdar *et al*, 2002), artrite reumatóide (Anderson *et al*, 1996), leucemias e linfomas (LeMaistre *et al*, 1992; Foss, 2001; Gao *et al*, 2012).

Figura 2 - Estrutura Esquemática da Toxina Diftérica



Fonte: Adaptado de Martinez *et al*, 2000.



### 1.5.2 Imunidade e controle da difteria

Os seres humanos são naturalmente susceptíveis à difteria. A imunidade gerada contra a difteria depende principalmente da presença de anticorpos específicos da classe IgG direcionados contra a toxina diftérica em níveis iguais ou superiores a 0,1 IU/mL (Galazka, 1993; Damasco *et al*, 2005; Pimenta *et al*, 2006). Ao contrário dos anticorpos gerados contra o fragmento A, os anticorpos gerados contra o fragmento B são capazes de neutralizar a atividade tóxica da toxina diftérica (Rose *et al*, 2005).

A imunidade ao *C. diphtheriae*, pode ser naturalmente obtida através da passagem de anticorpos maternos pela barreira placentária durante os primeiros meses de vida do feto, ou através de infecções assintomáticas que conferem imunidade em diferentes graus, dependendo da maior ou menor exposição dos indivíduos. A proteção conferida pelo tratamento do paciente com o Soro Anti-Diftérico (SAD) é de curta duração (em média duas semanas). A difteria normalmente não confere imunidade permanente e a reincidência é comum, devendo o doente continuar seu esquema de imunização após alta hospitalar (<http://www.saude.gov.br/vigilância> epidemiológica de doenças transmissíveis). A imunidade adquirida é obtida através da vacinação com o toxóide diftérico (presente na vacina tríplice bacteriana-DTP). Também conhecido como anatoxina diftérica, o toxoide diftérico é altamente eficaz na prevenção da doença grave ou fatal, quando o esquema de imunização é seguido corretamente.

A prevenção da difteria feita através da vacinação sistemática de crianças na faixa etária de um a quatro anos com a DTP é prática recomendada pela Organização Mundial de Saúde. Nestas circunstâncias, a proporção de indivíduos protegidos aumentou de menos de 5% em 1974 para 82% em 2009, devido ao foco em todo o mundo sobre a vacinação universal (McCormick & Czachor, 2013). A partir de 14 anos, a proteção diminui (50%) em consequência do declínio dos anticorpos, o que confirma a necessidade do uso de dose reforço de dez em dez anos. Em combinação com a vacina contra o tétano (dt), níveis de antitoxina da ordem de 0,01 IU/mL indicam a ausência de proteção; níveis de 0,01 a 0,09 IU/mL indicam proteção básica. Ambos observados em indivíduos adultos sugerem susceptibilidade para as formas severas da difteria (Björkholm *et al*, 1986) e a

necessidade de revacinação. Níveis inadequados de anticorpos anti-difteria na população adulta podem contribuir para o desencadeamento de novos surtos epidêmicos. Além disso, investigações realizadas na cidade do Rio de Janeiro, indicaram que a maioria dos indivíduos adultos sadios (doadores de sangue) exibia níveis inadequados de anticorpos circulantes contra a toxina diftérica (faixa etária de 18 a 30 anos) e somente 30% estavam completamente protegidos (Damasco *et al*, 2005; Pimenta *et al*, 2006). Em estudos posteriores foi observado que a maioria (71%) dos doadores militares jovens (18 a 30 anos de idade), estavam completamente protegidos contra a doença enquanto que a maioria (63%) dos desprotegidos encontrava-se no grupo de faixa etária de 41 a 64 anos de idade (Speranza *et al*, 2010). Estas diferenças podem ser explicadas pelo maior cuidado com o estado de saúde dos militares e as medidas profiláticas adotadas no período que antecede os exercícios de treinamento militar ou no emprego da tropa em missões reais (Speranza *et al*, 2010). Portanto, cinco anos após as primeiras recomendações do Ministério da Saúde relativas à administração de doses de reforço em adultos (Portarias Nº 597/GM de 8 de abril de 2004 e Nº 1.602 de 17 de Julho de 2006) os resultados dos estudos demonstraram que quase a metade da população adulta no Rio de Janeiro ainda permanece inadequadamente protegida contra difteria, incluindo os militares acima de 40 anos.

No município de São Paulo, em um estudo realizado com idosos (idade mediana de 84 anos) foi demonstrado que antes da vacinação com dT 18 % dos indivíduos estavam susceptíveis e após 30 dias da vacinação 78 % adquiriram proteção completa para difteria (Weckx *et al*, 2006). Outro estudo, investigando a imunidade humana à TD revelou que 82 % dos indivíduos com idade de 40 a 59 anos de idade eram susceptíveis à doença e em contrapartida 91% dos indivíduos com idade superior a 60 anos apresentaram proteção total, justificada pelos autores pelo lançamento e introdução em 1999 da campanha nacional de vacinação em idosos que vem sendo repetida (Divino-Goes, 2007). Ao contrário do observado no Rio de Janeiro, em São Paulo 86% dos adolescentes com idade de 10 a 20 anos estavam protegidos contra a difteria. Para todos os adolescentes o esquema de vacinação básica foi completado e a maioria (77%) recebeu dose reforço a cada 10 anos enquanto cerca de 13% (10) e 1% (20) precisavam de uma dose reforço imediata ou de revacinação básica, respectivamente (Dinelli *et al*, 2007).

### 1.5.3 Tipos de vacinas existentes para a difteria

A vacina tríplice bacteriana - DTP preconizada pelo Ministério da Saúde Brasileiro, para prevenir a difteria possui como componentes os toxóides tetânico e diftérico e células bacterianas inativadas de *Bordetella pertussis* adsorvidos em alumínio e tendo como conservante o timerosal (Raw, 2005). A vacina DTP começou a ser preparada no Brasil, pelo Instituto Butantan em 1967, segundo os padrões internacionais de potência e toxicidade, sendo que nos últimos anos a produção nacional correspondeu a 35 milhões de doses ao ano (Mallucelli & Carvalho, 1983 - 1984). O esquema de vacinação vigente no país indica 4 doses da vacina DTP (aos 2, 4 e 6 meses de idade com reforço aos 18 meses de vida). O Programa Nacional de Imunização (PNI) utiliza em média 30 milhões de doses da vacina DTP anualmente ([http://www.saude.gov.br/vigilância epidemiológica de doenças transmissíveis](http://www.saude.gov.br/vigilância_epidemiológica_de_doenças_transmissíveis)). O Ministério da Saúde considera as crianças com menos de cinco anos de idade a população alvo da vacina tríplice sendo a DTP obrigatória em crianças no primeiro ano de vida (Farhat *et al*, 2000).

Os efeitos adversos mais comuns decorrentes da imunização com DTP são: dor, vermelhidão e endurecimento local, febre, mal-estar geral e irritabilidade nas primeiras 24 e 48 horas. Também pode provocar sonolência, choro prolongado, convulsões e a síndrome hipotônico-hiporesponsivo (hipotonia, sudorese fria e diminuição da resposta a estímulos). Estudo recente descreve a ocorrência de nódulos subcutâneos, prurido persistente e alergia ao alumínio (Al) após a vacinação com vacinas Al-adsorvido, mas são considerados raros (Bergfors & Trollfors, 2013). Em casos de eventos adversos mais sérios, como convulsões nas primeiras 72 horas ou episódio hipotônico-hiporesponsivo nas primeiras 48 horas, é recomendável a mudança para a vacina DTP acelular. Esta vacina foi licenciada em 1998, para uso em crianças a partir dos seis meses de idade com esquema de imunização de cinco doses, a quantidade de toxoide diftérico que compõe esta vacina é menor. Contudo, os níveis de anticorpos gerados são menores do que os gerados com a DTP, não ocorre nenhuma consequência clínica. A DTP acelular pode ser administrada simultaneamente, com as vacinas contra hepatite B, *Haemophilus influenzae* B e poliovírus (Mortimer Jr & Wharton, 2004; Mahajan *et al*, 2012).

Na vacina dupla contra difteria e tétano (dupla bacteriana, dT) os toxóides são adsorvidos em hidróxido de alumínio, tendo o timerosal como conservante. Esta vacina é indicada para crianças com contra indicação de receber a vacina de *B. pertussis* e pode ser aplicada em menores de sete anos e gestantes. É indicada como imunizante primário ou como reforço de gestantes para a prevenção do tétano neonatal. O esquema de vacinação é o mesmo citado acima. Os eventos adversos são similares aos provocados pela imunização com DTP (Mortimer Jr & Wharton, 2004). A apresentação do tipo infantil (DT) é diferente do tipo adulto (dT) em termos da concentração da dose imunizante do toxóide diftérico. A vacina DT é específica para a imunização de crianças de 2 a 7 anos que também tenham contra indicação de receber o componente *B. pertussis* (Mortimer Jr & Wharton, 2004; Milstien, 2005).

Na **Tabela 1** estão apresentados os diferentes tipos de vacinas contra a difteria disponíveis no território nacional.

Tabela 1 - Diferentes tipos de vacinas contra difteria disponíveis no Brasil

Produto	Fabricante	Número de doses	Referências bibliográficas
DTP	Instituto Butantan	5	Mortimer Jr, 2004
DTP-aceular	Instituto Butantan	5	Raw <i>et al</i> , 2005
DT-infantil	Instituto Butantan	5	Raw <i>et al</i> , 2005
dT-adulto	Instituto Butantan	5	Raw <i>et al</i> , 2005
DTP-Hib	Instituto Butantan; Glaxo Smith Kline; Bio-Manguinhos	3	Milstien , 2005
DTP-HB	Instituto Butantan; Glaxo Smith Kline; Bio-Manguinhos	3	Papaevangelou , 1998 Raw <i>et al</i> , 2005
DTP- HB- Hib	Instituto Butantan; Glaxo Smith Kline; Bio-Manguinhos	4	Nolan <i>et al</i> , 2001 Aristequi <i>et al</i> , 2003
DTPa-HBV- IPV-Hib	Glaxo Smith Kline	4	Zepp <i>et al</i> , 2004 Heininger <i>et al</i> , 2007

DTP: anatoxina diftérica , anatoxina tetânica e *B. pertussis* inativada;

dT: anatoxina diftérica e anatoxina tetânica; DTP- HB- Hib: *Haemophilus influenzae* B; HB, Hepatite B.

Os avanços no desenvolvimento de vacinas combinadas também contribuem, para a produção de novas formulações vacinais contra a difteria. A DTP-HB é composta dos seguintes antígenos: anatoxina diftérica (D), anatoxina tetânica (T), com células bacterianas inativadas da *B. pertussis* e o principal antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBV) purificado (HBsAg), adsorvidos em sais de

alumínio. Os toxóides diftérico, tetânico e *B. pertussis* inativada são preparados da mesma forma que a vacina convencional DTP, usando tecnologia já estabelecida. O antígeno de superfície do HBV (HBsAg) é produzido por expressão em leveduras (*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*). A dose recomendada da vacina DTP-HB é de 0,5 mL e o esquema primário de vacinação consiste de três doses nos primeiros seis meses de vida, e pode ser dada na idade de seis a oito semanas. Doses posteriores devem ser administradas com intervalos de quatro ou oito semanas, quanto mais longo o intervalo entre doses posteriores, mais altos os títulos de anticorpos. Essa formulação tem sido recomendada pela Organização Mundial de Saúde e tem sido bem tolerada em crianças no primeiro ano de vida. A DTP-HB é adequada para uso somente em áreas com baixa endemicidade de hepatite (Nolan *et al*, 2001; Aristequi *et al*, 2003).

A vacina tetravalente DTP-Hib que combina os antígenos da vacina DTP e *H. influenzae* tipo B (Hib) é produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz (Papaevangelou, 1998; Raw *et al*, 2005) e foi introduzida no calendário básico de rotina no Brasil a partir de 2002, sendo recomendada aos 2, 4 e 6 meses de idade. Pode provocar vários eventos adversos, em sua maioria de caráter benigno, ocorrendo nas primeiras 48-72 horas que se seguem à aplicação da vacina. Estudos de vigilância ativa permitiram concluir, os eventos adversos mais comuns, avaliados em estudo realizado no Brasil (Clemens *et al*, 2003). Quanto aos eventos mais raros, tais como episódio hipotônico-hiporresponsivo e convulsões, em frequência similar ao encontrado com a vacina DTP também foram investigados (Martins *et al*, 2005).

A vacina pentavalente DTP-HB-Hib combina os antígenos da vacina tríplice bacteriana DTP com *H. influenzae* tipo B e de poliomielite adsorvidos em hidróxido de alumínio. A via de administração é intramuscular, podendo ser dada a partir do segundo, quarto e sexto mês de vida. O reforço pode ser dado aos 15 meses e 5 anos de vida e não é recomendada a maiores de cinco anos. Podem ocorrer efeitos adversos como febre baixa, dor, calor e inchaço local, irritabilidade, sonolência e convulsões (Nolan *et al*, 2001; Aristequi *et al*, 2003).

#### 1.5.4 Problemas relacionados com a vacina DTP e novas alternativas de vacina

Embora a difteria seja uma das doenças bem estudadas, existe uma constante preocupação na Saúde Pública. O agente etiológico (*C. diphtheriae*) não foi erradicado da população (Sevigny *et al*, 2013). Dentre os fatores que dificultam o controle da doença destaca-se a vacinação com o toxóide diftérico que é capaz de proteger contra os efeitos da toxina diftérica, porém não impede a colonização e infecção pelo microrganismo. Indivíduos imunizados também podem se apresentar como portadores assintomáticos e desempenhar um papel importante na transmissão da difteria. Além disso, um percentual de 1 a 2% da população não responde a doses imunizantes do toxóide diftérico com níveis detectáveis de anticorpos circulantes (Damasco *et al*, 2005). Além desses, outros problemas não resolvidos com os componentes presentes na vacina são aqueles relacionados com proteínas contaminantes. Acredita-se que esses contaminantes sejam resíduos oriundos do processo de detoxificação, uma vez que os toxóides não são completamente purificados. O resultado após a vacinação é um quadro clínico de reatogenicidade, a vacina DTP não pode ser administrada de uma só vez, requerendo três doses para induzir proteção (Cunha *et al*, 2013). Estudos foram realizados na tentativa de buscar alternativas para reduzir a reatogenicidade da vacina DTP. Dentre eles podemos destacar a purificação completa do toxóide diftérico através da utilização de antígenos de reatividade cruzada como o CRM 197 (*Cross Reacting Material 197*) (Orr *et al*, 1999) ou da toxina detoxificada geneticamente (Johnson & Nicholls, 1994). Essas opções oneram os custos da produção da vacina DTP.

A oferta mundial de vacinas está atravessando uma revolução e o resultado é a disponibilização de novos protótipos vacinais e produtos (Cha, 2012; Romaniuk *et al*, 2012). A **Tabela 2** mostra algumas das alternativas existentes para novas vacinas contra a difteria. No entanto, uma importante alternativa no sentido de minimizar custos e os riscos de reatogenicidade consiste no desenvolvimento de uma nova vacina utilizando vetores vivos atenuados capazes de expressar antígenos definidos e protetores em vivo (sistema de liberação de antígenos) como, por exemplo, a vacina BCG (*Mycobacterium bovis* cepa BCG) utilizada mundialmente contra a

tuberculose (*apud* Bloom & Fine, 1994), através da sua modificação por engenharia genética para que possa ser utilizada na imunização contra a difteria. Essa alternativa é particularmente importante para os países pobres e em desenvolvimento que fazem uso permanente da vacina BCG em seus programas de imunização. Adicionalmente, trata-se também de uma proposta importante para o desenvolvimento de vacinas multivalentes.

Tabela 2 - Alternativas existentes para novas vacinas contra a difteria

Produto	Referências bibliográficas
CRM 228 mutagenizado	Johnson & Nicholls, 1994
BCGr - CRM 197	Miyaji <i>et al</i> , 2001
BCGr - CRM 197 fusionado ao fragmento C da toxina tetânica	Mazzantini <i>et al</i> , 2004
Vacina oral - CRM 197 preparada com micropartículas	Rydell & Sjöholm, 2004; Rydell <i>et al</i> , 2006
Vacina oral - DT com partículas de ISCOMS	Aguila <i>et al</i> , 2006

ISCOMS, Immunostimulating Complexes.

CRMs, Cross-reacting materials;

BCGr, *M. bovis* recombinante;

#### 1.5.5 Tecnologia de desenvolvimento de novas vacinas baseadas na modificação genética da vacina BCG (bacilo de Calmette e Guérin)

A sub-cepa Moreau utilizada no Brasil é umas das 13 variantes da cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* obtida por Camille Calmette e Alphonse Guérin, no século passado através de sub-cultivos seriados *in vitro* durante 13 anos da cepa virulenta de *M. bovis*, causadora da tuberculose bovina. A vacina BCG passou a ser administrada oralmente em humanos a partir de 1921. Em 1925, uma amostra da vacina BCG foi enviada ao pesquisador Arlindo de Assis, denominada BCG-Moreau. Esta cepa tem sido utilizada para a produção da vacina contra a tuberculose no Brasil (*apud* Bévolo-de-Andrade *et al*, 2005). Dentre as vantagens do BCG podemos



destacar a baixa toxicidade e a experiência do uso em aproximadamente três bilhões de pessoas distribuídas por todo o mundo (Stover *et al*, 1991). O BCG pode ser administrado logo após o nascimento uma vez que não sofre a influência de anticorpos maternos. Sua utilização em dose única permite sensibilizar indivíduos de 5-50 anos de idade e induzir resposta imune de longa duração para tuberculoproteínas (Chapman *et al*, 2012; Grode *et al*, 2013). Além de ser a vacina viva de maior termoestabilidade já observada ainda tem a vantagem de poder ser produzida a baixo custo 0.1 - 0.2 US\$ por dose (Fine *et al*, 1999). O BCG também tem sido utilizado na terapia contra o câncer (Luo *et al*, 2004; Rossi *et al*, 2013; Chevalier *et al*, 2014) em virtude de sua atividade como um potente adjuvante tanto em humanos quanto em animais (Convit & Aranzazu, 1982; Lu *et al*, 2012; Singh *et al*, 2013).

O BCG original foi distribuído para produtores no mundo todo porém, não foi mantido em condições padronizadas pelos laboratórios receptores. Este processo teve como resultado o aparecimento de diferentes estirpes do BCG com características genóticas e fenotípicas diferentes, da cepa original e entre si, inclusive com relação à virulência residual. Análises comparativas entre os diferentes BCGs usando dados genômicos e proteômicos atribuem à variabilidade genética as diferenças na eficácia protetora obtida nos diferentes estudos clínicos e genéticos (Behr *et al*, 1999; Berrêdo-Pinho *et al*, 2011).

Estudos recentes de genômica comparativa entre as diferentes sub-cepas de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* confirmaram que elas perderam parte do genoma durante o processo de atenuação e, também, após a sua distribuição para o mundo. Como resultado, as 13 subcepas derivadas do *M. bovis* BCG original não são geneticamente idênticas entre si. A sub-cepa Moreau perdeu as regiões genômicas RD1, que contém nove fases abertas de leitura (ORFs) – perdida por todas as cepas de BCG - e a RD16 que contém seis ORFs. O consenso atual é que as diferentes sub-cepas de BCG perderam a sua eficácia em função das deleções ocorridas durante o processo de passagens seriadas por manipulação em laboratório (Behr *et al*, 1999).

Após a vacinação o BCG é rapidamente fagocitado por macrófagos e persiste no compartimento fagossomal, sendo assim capaz de induzir resposta do tipo Th1. Macrófagos murinos produzem IL-12, IL-1 e TNF- $\alpha$  em resposta a infecção por *M.*

*bovis* BCG. IL-12 e TNF- $\alpha$  induzem a secreção de INF- $\gamma$  por células “natural killer” (NK) e célula T CD4+. O INF- $\gamma$  induz a diferenciação para a resposta Th1, importante na erradicação de vários patógenos intracelulares como *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *M. leprae*, *M. tuberculosis* e parasitos como *S. mansoni*. Além da resposta Th1, o *M. bovis* BCG é capaz de induzir resposta Th2 com produção de anticorpos, que podem levar semanas após a vacinação para ser detectada (Fennely *et al*, 1995). O BCG é conhecido por induzir resposta imune celular de longa duração (Chapman *et al*, 2012; Grode *et al*, 2013).

A utilização da vacina BCG no desenvolvimento de vacinas multivalentes foi sugerida somente no final da década de 80, com o aparecimento de diferentes sistemas genéticos para a expressão de diferentes antígenos em micobacterias (Matsuo *et al*, 1990; Fuerst *et al*, 1990,1991; Stover *et al*, 1991; Aldovani & Young, 1991; Murray *et al*, 1992; Stover *et al*, 1993). Essa tecnologia requer o domínio da construção de vetores plasmidiais adequados para expressar ou secretar antígenos codificados por eles de maneira estável (Dellagostin *et al*, 1993) e da técnica de transformação de micobactérias (Dellagostin *et al*, 1995). O valor potencial do BCG como vetor de genes (BCG recombinante ou BCGr) fundamenta-se na possibilidade de ser transformado com genes de outros patógenos visando à expressão de antígenos heterólogos *in vivo*. Além disso, a tecnologia do BCGr tem potencial adicional para o desenvolvimento de vacinas multivalentes de liberação de antígenos (Bastos *et al*, 2009; Bonaldo *et al*, 2010; Chapman *et al*, 2012; Grode *et al*, 2013). Na última década vários trabalhos na literatura demonstraram que a imunização com o BCGr foi capaz de induzir respostas imunológicas celular e humoral, tanto contra antígenos bacterianos, virais, como de parasitos, além da expressão de citocinas em modelos animais como camundongo, cabra, cobaio, coelho, frango ou primata (**Tabelas 3- 6**).

Tabela 3 - Alguns genes de diferentes bactérias expressos em *M. bovis* (BCGr)

<b>Genes</b>	<b>Promotores</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
LacZ ( <i>Escherichia coli</i> )	<i>hsp60</i>	Camundongo	Stover <i>et al</i> , 1991
$\alpha$ -galactosidase ( <i>E. coli</i> )	$P_{AN}$	Camundongo	Murray <i>et al</i> , 1992
<i>OspA</i> ( <i>Borrelia burgdorferi</i> )	<i>hsp60</i> + peptídeo sinal de 19 kDa de (MTb), <i>hsp60</i> + antígeno de <i>M. bovis</i>	Camundongo	Stover <i>et al</i> , 1993
LacZ ( <i>E. coli</i> )	$P_{AN}$	Cobaio	Lagranderie <i>et al</i> , 1993
<i>PspA</i> ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )	<i>hsp60</i> + seqüência sinal de de 19 kDa de <i>M. tuberculosis</i> , <i>hsp60</i> + seqüência líder da proteína <i>PspA</i>	Camundongo	Langermann <i>et al</i> , 1994
Proteína híbrida: Toxina pertussis (S1) e Tetano (C)	Promotor e seqüência sinal do antígeno 85 A de <i>M. tuberculosis</i>	Camundongo	Abomoelak <i>et al</i> , 1999
<i>E. coli</i> subunidade B (etxB) enterotoxina LT-Bh	<i>hsp60</i> , peptídeo sinal de 19 kDa de <i>M. tuberculosis</i> , <i>hsp60</i> + antígeno $\alpha$ de <i>M. bovis</i>	Camundongo	Hayward <i>et al</i> , 1999
<i>OspA</i> ( <i>B. burgdorferi</i> )	<i>hsp60</i>	Humano	Edelman <i>et al</i> , 1999
Listeriolisina ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	<i>hsp60</i>	<i>In vitro</i>	Conradt <i>et al</i> , 1999
S1 subunidade ( <i>Bordetella pertussis</i> )	<i>pBlaF*</i>	Camundongo	Nascimento <i>et al</i> , 2000
Ag85B ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	ag85b	Cobaio	Horwitz <i>et al</i> , 2000
Antígenos de <i>M. leprae</i>	ag85b	Camundongo	Ohara <i>et al</i> , 2001
Subunidade B (CTB)Toxina colérica	<i>hsp60</i> + antígeno $\alpha$ de <i>M. bovis</i>	Camundongo	Biet <i>et al</i> , 2002

Continua

S1 ( <i>B. pertussis</i> )	<i>pBlaF*</i>	Camundongo	Nascimento <i>et al</i> , 2008
Ag85B-mpt64,mpt8.4 ( <i>M.tuberculosis</i> )	<i>hsp60</i>	Camundongo	Qie <i>et al</i> , 2008
Ag85B-IL15	<i>Ag85b</i>	Camundongo	Tang <i>et al</i> , 2008
Ag85B ( <i>M.tuberculosis</i> ) em BCG mutado	<i>Ag85b</i>	Cobaio	Tullius <i>et al</i> , 2008
P97 ( <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ) e LTB <i>E. coli</i> )	<i>hsp60, 18 kDa</i>	Camundongo	da Silva <i>et al</i> , 2008
Ag85C ( <i>M.tuberculosis</i> )	<i>hsp60</i>	Cobaio	Jain <i>et al</i> , 2008
Ag85B-Rv3425 ( <i>M.tuberculosis</i> )	<i>hsp60</i>	Camundongo	Wang <i>et al</i> , 2008
Ag85A ( <i>M.tuberculosis</i> )	-	Macaco	Sugawara <i>et al</i> , 2009
Perfringolisina O ( <i>Clostridium perfringens</i> )-Ag85A-		Macaco	Sugawara <i>et al</i> , 2009
Ag85B-TB10.4 ( <i>M.tuberculosis</i> )	<i>Ag85b</i>	Camundongo Cobaio	Sun <i>et al</i> , 2009

---

Tabela 4 - Alguns genes de diferentes vírus expressos em *M. bovis* (BCGr)

<b>Genes</b>	<b>Promotores</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
p17Gag (HIV-1)	<i>Antígeno <math>\alpha</math></i>	<i>In vitro</i>	Matsuo <i>et al</i> , 1990; Wada <i>et al</i> , 1996
Gag, Env, Pol, (HIV-1)	<i>hsp70</i>	Camundongo	Aldovini & Young, 1991
Nef (HIV-1)	<i>groES</i>	Camundongo	Winter <i>et al</i> , 1991
VP1 140-160 Epitopo (FMDV), Gag (SIV)	<i>18 kDa</i>	<i>In vitro</i>	Dellagostin <i>et al</i> , 1993
Gag (SIV)	<i>Hsp70</i>	Macaco	Yasutomi <i>et al</i> , 1993
Nef (SIV <sub>mac251</sub> )	<i>P<sub>ANi</sub></i>	Camundongo	Winter <i>et al</i> , 1995
Proteína N Vírus Sarampo	<i>Hsp60</i>	Camundongo	Fennelly <i>et al</i> , 1995
Proteína N Vírus Sarampo	<i>Hsp60</i>	Macaco	Zhu <i>et al</i> , 1997
L1, E7 (Papilomavírus)	<i>Hsp70</i>	Camundongo	Jabbar <i>et al</i> , 2000
Nef, Gag, Env, Pol (SIV)	<i>Hsp70</i>	Macaco	Leung <i>et al</i> , 2000
Proteína N (Vírus Raiva)	<i>18 kDa, Hsp60</i>	Camundongo	da Cruz <i>et al</i> , 2001
Proteína GP5 e M (PRRSV)	<i>Hsp60</i>	Camundongo	Bastos <i>et al</i> , 2002
Env V3 (HIV-1)	<i>hsp60</i>	Cobaio	Kawahara <i>et al</i> , 2002
Nef, Gag, Env (SIV)	<i>P<sub>ANi</sub></i>	Macaco	Mederle <i>et al</i> , 2003
CTL (HCV)	<i>Antígeno <math>\alpha</math></i>	Camundongo	Uno-Furuta <i>et al</i> , 2003
Proteína GP5 e M (PRRSV)	<i>Hsp60</i>	Suíno	Bastos <i>et al</i> , 2004
Antígeno S (HBV)	<i>P<sub>ANi</sub></i>	Camundongo	Rezende <i>et al</i> , 2005

Continua

Gag (SIV)	<i>Hsp60</i>	Macaco	Ami <i>et al</i> , 2005
P24 Gag (HIV)	<i>Hsp60</i>	Camundongo	Kanekiyo <i>et al</i> , 2005
Env V3 (HIV-1)	<i>hsp60</i>	Macaco	Someya <i>et al</i> , 2005
L1 (CRPV)	<i>mtrA</i>	Coelho	Govan <i>et al</i> , 2006
P27 Gag (SIV)	<i>Hsp60</i>	Cobaio	Kawahara <i>et al</i> , 2006
VP6 (Rotavírus)	<i>Hsp60</i>	Camundongo	Dennehy <i>et al</i> , 2007
S1 (IBV)	<i>Hsp70</i>	Frango	Bai <i>et al</i> , 2007
Env (HIV)	<i>Antígeno <math>\alpha</math></i>	Camundongo	Yu <i>et al</i> , 2007
L2E7E2 (CRPV)	<i>mtrA</i>	Coelho	Govan <i>et al</i> , 2007
CtEm, HLA-A2.1 (HCV)	<i>Hsp60</i>	Camundongo	Wei <i>et al</i> , 2008
Antígenos N e M2 (RSV)	<i>Hsp60</i>	Camundongo	Bueno <i>et al</i> , 2008
GagE (HIV-1)	<i>Hsp60</i>	Camundongo	Promkhatkaew <i>et al</i> , 2009
Gag, Pol, Env (SIV)	<i>Antígeno <math>\alpha</math></i>	Macaco	Cayabyab <i>et al</i> , 2009
BCGr/(SIV)		Macaco	Bonaldo <i>et al</i> , 2010

---

**CRPV**, Papilomavírus de coelho;

**HIV**, Vírus da Imunodeficiência Humana;

**HBV**, Vírus da Hepatite B;

**HCV**, Vírus da Hepatite C;

**IBV**, Vírus da infecção brônquica;

**PRRSV**, Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína;

**VSR**, Vírus sincicial respiratório e **SIV**, Vírus da Imunodeficiência Símia.

Tabela 5 - Alguns genes de diferentes protozoários expressos em *M. bovis* (BCGr)

<b>Genes</b>	<b>Promotores</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
gp63 ( <i>L. major</i> )	<i>hsp60</i>	Camundongo	Connell <i>et al</i> , 1993
Sm28GST ( <i>Schistosoma mansoni</i> )	<i>hsp60</i>	Camundongo	Kremer <i>et al</i> , 1996
GST ( <i>S. haematobium</i> )	<i>hsp60</i>	Camundongo	Kremer <i>et al</i> , 1998
MSP1 ( <i>P. yoelli</i> ) GRA1	<i>Antígeno <math>\alpha</math></i>	Camundongo	Matsumoto <i>et al</i> , 1998
( <i>Toxoplasma gondii</i> ) LCR1	85A	Camundongo	Supply <i>et al</i> , 1999
( <i>Leishmania chagasi</i> )	<i>Hsp60</i>	Ovelha Camundongo	Streit <i>et al</i> , 2000
MSA2 ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	<i>Hsp70</i>	Camundongo	Zheng <i>et al</i> , 2001
CSP ( <i>Plasmodium yoelii</i> )	<i>hsp70</i>	Camundongo	Zheng <i>et al</i> , 2002
Sj26GST ( <i>S. japonicum</i> )	<i>Hsp70</i>	Camundongo	Dai <i>et al</i> , 2003
Sm14 ( <i>S. mansoni</i> )	<i>pBlaF*</i>	Camundongo	Varaldo <i>et al</i> , 2004
F2R(II)EBA, (NANP)3 ( <i>P. falciparum</i> )	<i>pAL500</i>	Camundongo	Rapeah <i>et al</i> , 2006
ROP2 ( <i>T. gondii</i> )	<i>hsp60</i>	Camundongo	Wang <i>et al</i> , 2007
Em113/Em14.3.3 ( <i>Echinococcus multilocularis</i> )	-	Camundongo	Li <i>et al</i> , 2007
RAP-1 ( <i>Babesia bovis</i> )	<i>pBlaF*</i> , 18 kDa, <i>hsp60</i>	Camundongo	Santangelo <i>et al</i> , 2007
Rho ( <i>Eimeria tenella</i> )	<i>Hsp60</i>	Frango	Wang <i>et al</i> , 2009

Tabela 6 – Alguns genes de diferentes citocinas expressas em *M. bovis* (BCGr)

<b>Citocina</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>Efeito imunológico</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
IL-2	Camundongo	Citotoxicidade, regulação de IL-2, INF- $\gamma$	Yamada <i>et al</i> , 2000
IL-2, IL-18	Camundongo	Resposta imune TH-1	Young <i>et al</i> , 2002
IL-18	Camundongo	Resposta imune TH-1	Luo <i>et al</i> , 2004
INF- $\gamma$	Camundongo	Regular expressão de MHC-I	Arnald <i>et al</i> , 2004
IL-18	Camundongo	Produção INF- $\gamma$	Biet <i>et al</i> , 2005
IL-18	Camundongo	Resposta imune MHC-II	Biet <i>et al</i> , 2005
IFN- $\alpha$ -2b	In vitro	Citotoxicidade	Liu <i>et al</i> , 2009

**IL**, Interleucina;

**IFN**, Interferon.



A capacidade de se detectar anticorpos como resposta aos antígenos expressos pelo BCG recombinante em camundongos, um ou vários meses após a vacinação, confirma que os vetores plasmidiais persistem no citoplasma do BCG *in vivo*, mesmo na ausência de pressão seletiva (presença de antimicrobianos). Os primeiros experimentos de expressão de antígenos heterólogos em BCG foram realizados com a expressão citoplasmática do marcador de seleção codificado pelo gene *aph* do transposon TN 903 e do gene codificador do antígeno de 65 kDa do *M. leprae* (Jacobs *et al*, 1987; Snapper *et al*, 1988). Posteriormente, foram construídos diferentes vetores bifuncionais capazes de replicação tanto em *Escherichia coli* quanto em micobactérias, bem como vetores de integração contendo seqüências de micobacteriófagos (Husson *et al*, 1990; Lazraq *et al*, 1990; Labidi *et al*, 1992; Dellagostin *et al*, 1993; Gavigan *et al*, 1995). Adicionalmente, o uso de promotores fortes derivados das proteínas de *stress hsp60* e *hsp70* de BCG incorporados em vetores tanto extra-cromossomais como integrativos permitiram a expressão de diferentes genes (Aldovani & Young, 1991; Fuerst *et al*, 1992; Haeseleer *et al*, 1993; Lagranderie *et al*, 1993; Stover *et al*, 1993; Yasutomi *et al*, 1993; Abdelhak *et al*, 1995; Wada *et al*, 1996).

O gene *lacZ* de *E. coli* foi expresso em *M. bovis* sob o comando do promotor  $P_{AN}$  e a construção utilizada foi capaz de induzir uma resposta imune humoral e celular contra a proteína de interesse (Murray *et al*, 1992). O BCGr demonstrou também resultados positivos para a indução de resposta imune de longa duração acompanhada de altos títulos de anticorpos em camundongos inoculados com BCGr expressando a sub-unidade S1 da toxina pertussis (Medeiros *et al*, 2005), OspA de *Borrelia burgdorferi* (Stover *et al*, 1993), PspA de *Streptococcus pneumoniae* (Langermann *et al*, 1994), GRA1 de *Toxoplasma gondii* (Supply *et al*, 1999) ou gp 63 de *Leishmania major* (Connell, 1993; Abdelhak *et al*, 1995).

O BCGr também é um bom candidato contra os antígenos de HIV. Aldovini & Young (1991) reportaram a expressão de diversos epítomos do vírus HIV-1 em *M. bovis* sob a ação do promotor *hsp70*, sendo esta bactéria capaz de induzir resposta imune celular e humoral. Uma versão produzindo o epítomo *env* V3 de HIV fusionado a um antígeno micobacteriano de secreção estimulou linfócitos T citotóxicos peptídeo V3 específico (Kameoka *et al*, 1994). Além disso, estudos sobre a eficácia de algumas vacinas BCGr em humanos foram desenvolvidos, entre eles com a OspA (Edelman *et al*, 1999) e com antígenos de *M. tuberculosis*. Foi observado um

aumento da eficácia de uma vacina contra tuberculose em camundongos, baseada no BCGr (BCG auxotrófico para urease-C secretando listeriolisina de *Listeria monocytogenes*), capaz de induzir e demonstrar proteção contra *M. tuberculosis* por via aerossólica. Essa vacina também foi capaz de proteger contra a nova cepa de *M. tuberculosis* Beijing/W (Bifani *et al*, 2002; Grode *et al*, 2005).

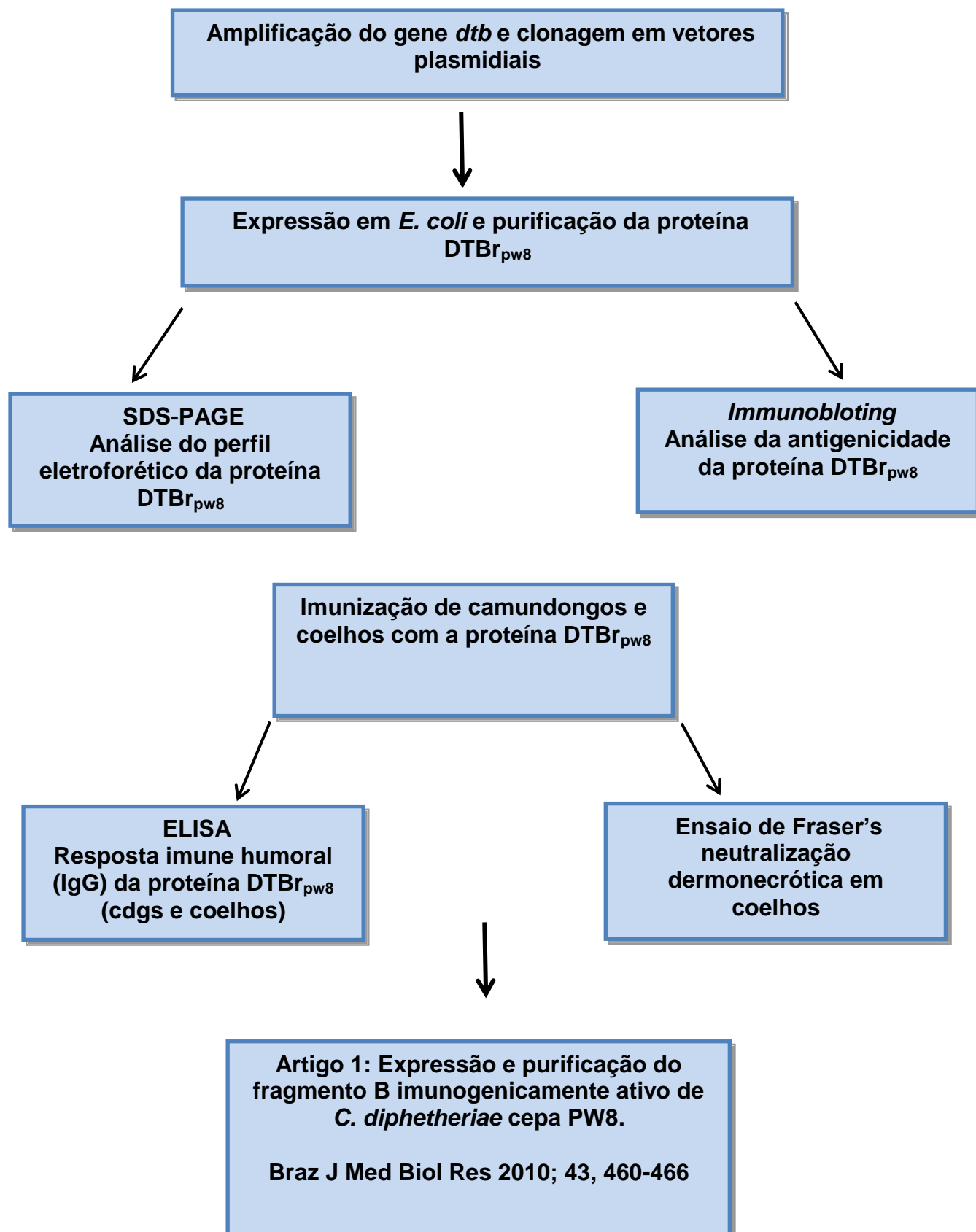
## 2 OBJETIVOS

Diante do que foi considerado acima, o presente estudo teve como objetivo geral a construção e avaliação preliminar de uma nova cepa de BCG obtida através da transformação do *M. bovis* BCG (sub-cepa Moreau) com um sistema plasmidial para a expressão intracelular da sequência de DNA que codifica o fragmento B da toxina diftérica, originada da cepa vacinal do *C. diphtheriae*, Park-Williams 8.

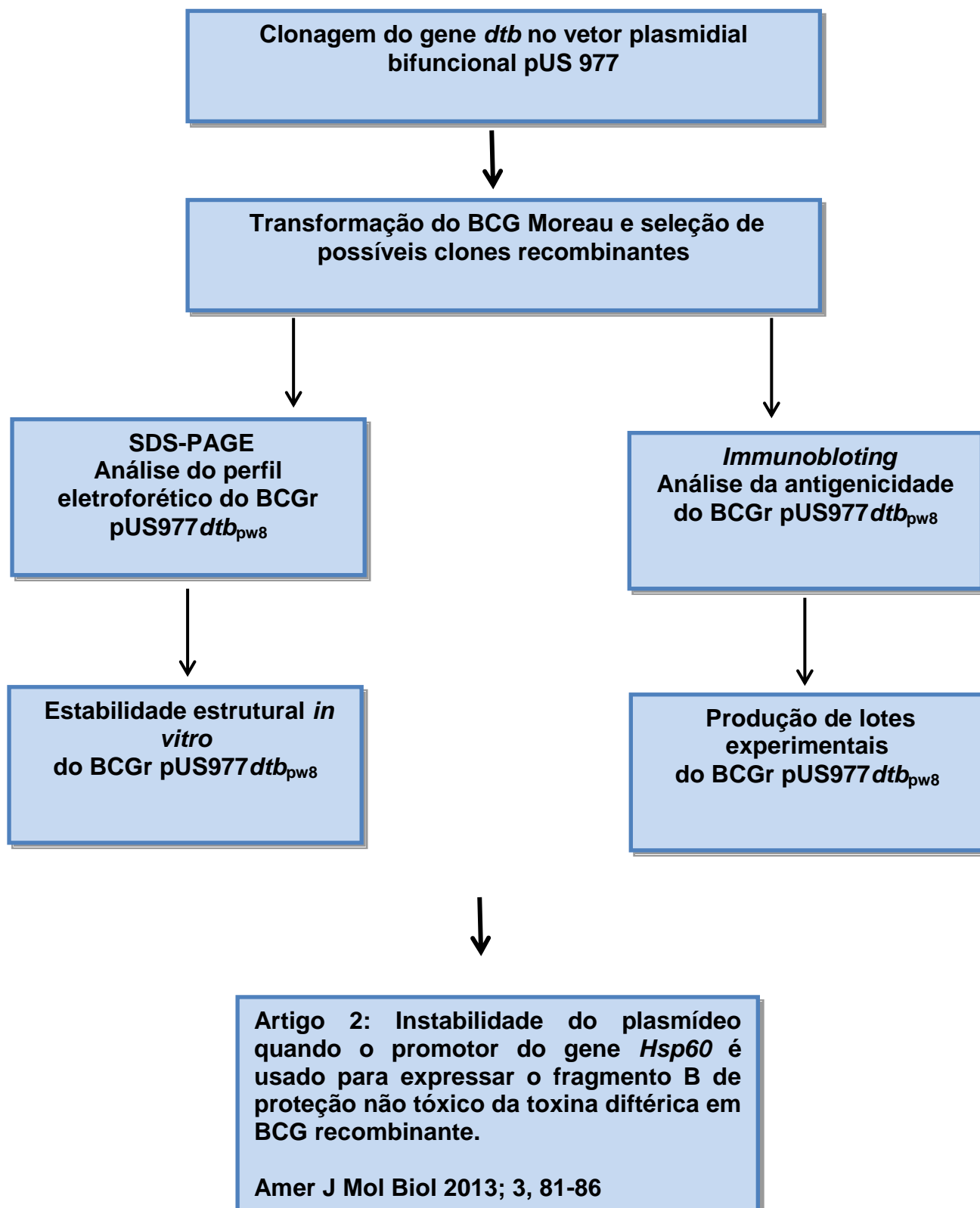
Neste sentido, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Amplificação por PCR da sequência de DNA codificadora do DTB, clonagem em vetor plasmidial, expressão em *E. coli* e purificação do DTB recombinante (DTBr<sub>pw8</sub>);
- b) Análise do perfil eletroforético do DTBr<sub>pw8</sub> em gel de SDS-PAGE e da antigenicidade através da técnica de *Immunobloting*; contra soro anti-toxóide diftérico;
- c) Avaliação da capacidade da proteína DTBr<sub>pw8</sub> de induzir uma resposta humoral anti-toxóide diftérico em camundongos BALB/c e coelhos New Zealand;
- d) Ensaio de neutralização dermonecrótica em coelhos New Zealand;
- e) Clonagem da sequência de DNA codificadora do gene *dtb* no vetor plasmidial bifuncional pUS977 para expressão intra-citoplasmática;
- f) Transformação do *M. bovis* (BCG sub cepa Moreau) com a construção pUS977<sub>dtb</sub><sub>pw8</sub>; análise do perfil eletroforético (SDS-PAGE) e da antigenicidade (*Immunobloting*) de lisados do BCGr pUS977<sub>dtb</sub><sub>pw8</sub> contra soro anti-toxóide diftérico;
- g) Avaliação *in vitro* e *in vivo* da estabilidade estrutural e funcional do BCGr pUS977<sub>dtb</sub><sub>pw8</sub>;
- h) Avaliação da capacidade do BCGr pUS977<sub>dtb</sub><sub>pw8</sub> de induzir uma resposta humoral anti-toxóide diftérico em camundongos BALB/c;
- i) Avaliação da capacidade de infecção e persistência intracelular do BCGr pUS977<sub>dtb</sub><sub>pw8</sub> em monócitos humanos da linhagem THP-1;
- j) Avaliação da persistência intracelular do BCGr em esplenócitos de camundongos imunizados com o BCGr pUS977<sub>dtb</sub><sub>pw8</sub>;
- k) Avaliação da capacidade do BCGr pUS977<sub>dtb</sub><sub>pw8</sub> de induzir anticorpos neutralizantes (soro-neutralização da toxina diftérica em células Vero).

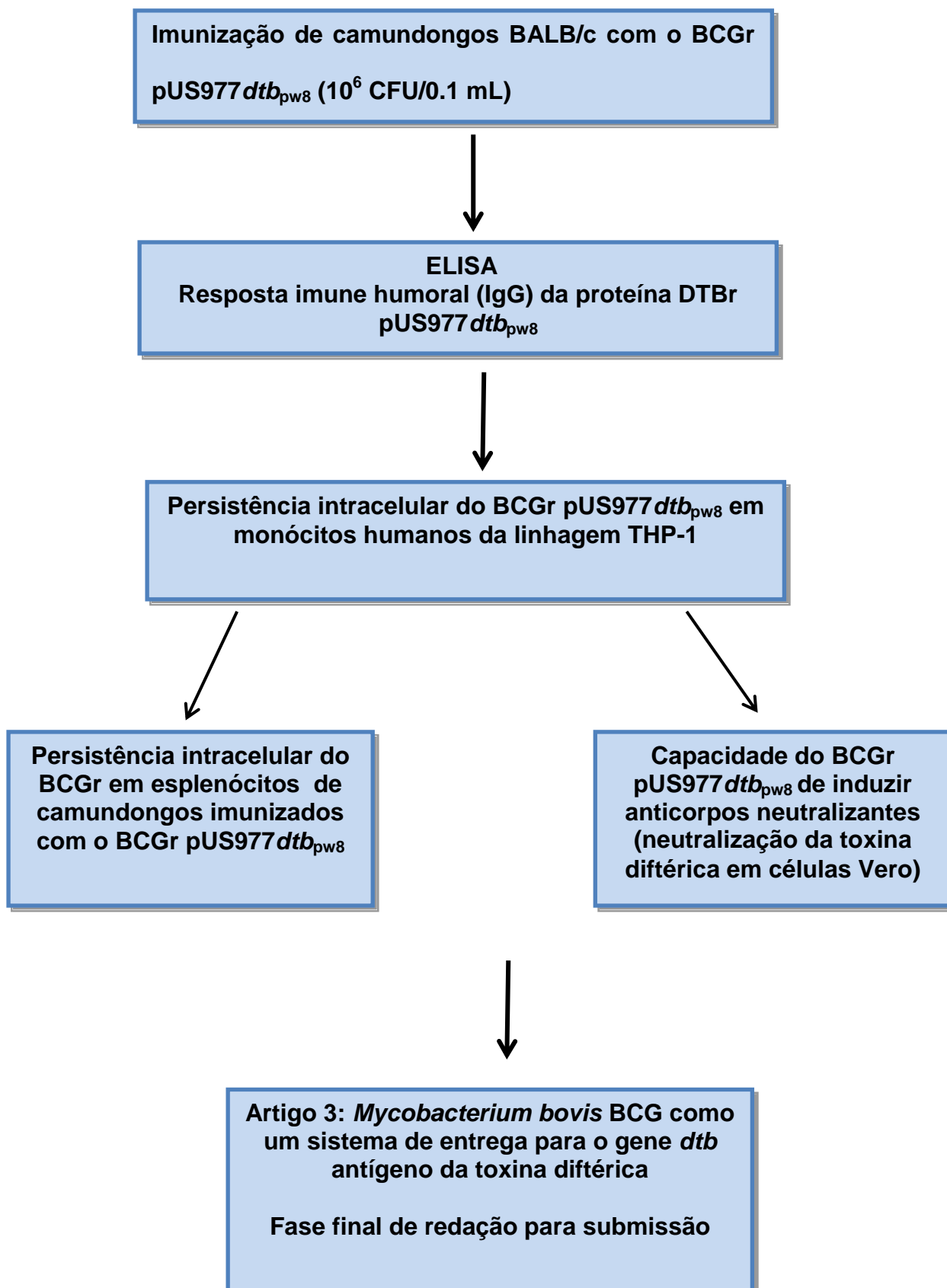
## Desenho Experimental 1



## Desenho Experimental 2



### Desenho Experimental 3



### 3 RESULTADOS

**CONSIDERAÇÕES GERAIS** – Parte dos resultados obtidos foram realizados em minha tese de mestrado (construímos uma cepa de BCG recombinante expressando o fragmento B da toxina diftérica em *M. smegmatis* e *M. bovis*);

– Os resultados parciais deste estudo culminaram na publicação de dois manuscritos e um terceiro em fase de redação final para submissão, apresentados a seguir:

#### **ESTUDO 1**

1. **D.V. Nascimento**, E.M.B. Lemes, J.L.S. Queiroz, J.G. Silva Jr., H.J. Nascimento, E.D. Silva, R. Hirata Jr., A.A.S.O. Dias, C.S. Santos, G.M.B. Pereira, A.L. Mattos-Guaraldi and G.R.G. Armoa. Expressão e purificação do fragmento B imunogenicamente ativo de *Corynebacterium diphtheriae* cepa Park Williams 8. Braz J Med Biol Res 2010; 43, 460-466. **(Qualis A1)**

#### **ESTUDO 2**

2. **Dilzamar V. Nascimento**, Odir A. Dellagostin, Geraldo M. B. Pereira, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Geraldo R. Garcia Armôa. Instabilidade do plasmídeo quando o promotor do gene *Hsp60* é usado para expressar o fragmento B de proteção não tóxico da toxina diftérica em BCG recombinante. Amer J Mol Biol 2013; 3, 81-86. **(Qualis A1)**

#### **ESTUDO 3**

3. **Dilzamar V. Nascimento**, Odir A. Dellagostin, Denise C. S. Matos, McIntosh D, Raphael Hirata Jr, Geraldo M. B. Pereira, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Geraldo R.G. Armôa. *Mycobacterium bovis* BCG como um sistema de entrega para o gene *dtb* antígeno da toxina diftérica (**redação final para submissão**)

### 3.1 Artigo 1: Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 *Corynebacterium diphtheriae* strain toxin

**Artigo 1:** Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 *Corynebacterium diphtheriae* strain toxin.

**Autores:** D.V. Nascimento, E.M.B. Lemes, J.L.S. Queiroz, J.G. Silva Jr., H.J. Nascimento, E.D. Silva, R. Hirata Jr., A.A.S.O. Dias, C.S. Santos, G.M.B. Pereira, A.L. Mattos-Guaraldi and G.R.G. Armôa.

Braz J Med Biol Res 2010; 43, 460-466. **(Qualis B2)**

**(Qualis A1)**

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a construção de uma versão com tag hexahistidine do fragmento B da toxina diftérica (DTB) representa um passo importante no estudo das propriedades biológicas do DTB, porque permitiu a produção da proteína recombinante pura DTB (DTBr) em menos tempo e com maior rendimento comparado aos atualmente disponíveis. No presente estudo, o DNA genômico de *C. diphtheriae* cepa vacinal Parque Williams 8 (PW8) foi usado como um molde para a amplificação do gene *dtb*. Após a amplificação, o gene *dtb* foi clonado e expresso em *E. coli* competentes células M15™ usando o vetor de expressão PQE-30™. O lisado obtido a partir de células transformadas de *E. coli* contendo o DTBr<sub>PW8</sub> foi clarificado por centrifugação e purificado por cromatografia de afinidade. A homogeneidade do DTBr<sub>PW8</sub> purificada foi confirmada por *immunoblotting* usando o anticorpo policlonal anti-toxóide diftérico e a resposta imune induzida em animais imunizados com DTBr<sub>PW8</sub> foi avaliada por ELISA e ensaios de neutralização dermonecrótica. O principal resultado deste estudo trata-se de um método alternativo e acessível para a expressão e purificação de DTBr<sub>PW8</sub>



imunogenicamente ativo utilizando sistemas disponíveis comercialmente. Os dados também forneceram evidências preliminares de que coelhos imunizados com DTBr<sub>PW8</sub> são capazes de montar uma resposta neutralizante contra o desafio com *C. diphtheriae* toxigênica.

Palavras-chave: Fragmento B; toxina diftérica; difteria; gene *dtb*; *E. coli*; expressão gênica; cromatografia de afinidade de metal imobilizado.

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

D.V. Nascimento<sup>1,4</sup>, E.M.B. Lemes<sup>1</sup>, J.L.S. Queiroz<sup>1</sup>, J.G. Silva Jr.<sup>1</sup>,  
H.J. Nascimento<sup>1</sup>, E.D. Silva<sup>1</sup>, R. Hirata Jr.<sup>4</sup>, A.A.S.O. Dias<sup>3</sup>, C.S. Santos<sup>4</sup>,  
G.M.B. Pereira<sup>2,4</sup>, A.L. Mattos-Guaraldi<sup>4</sup> and G.R.G. Armoa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, <sup>2</sup>Instituto Oswaldo Cruz,

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>4</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

### Abstract

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

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

### Introduction

Diphtheria toxin (DT) is an A-B type protein toxin produced by *Corynebacterium diphtheriae* (1-4). The B fragment (DTB) binds to the receptor on the host cell surface and mediates the translocation of the A fragment (DTA) through the cell membrane, which inactivates the protein synthesis elongation factor 2 in some mammalian cells (5-9). The expression of recombinant DTB (rDTB) in other prokaryotic organisms is necessary to understand the role of DT in the development and severity of toxemic infectious processes (10-12). The expression of rDTB in bacteria was initially considered difficult, due in part to the fact that DTB without DTA was found to be rapidly degraded during the process (13,14). In the early experiments that succeeded in producing rDTB in *Escherichia coli*, only low yields were achieved (15). Later,

Spilsberg et al. (16) constructed a hexahistidine-tagged version of a modified rDTB that was expressed in higher levels by *E. coli* BL21. Attempts to produce immunogenically reactive rDTB in bacteria in a more accessible form using newer expression systems are of interest. The objective of the present study was to express the *dtb* gene of the Park Williams 8 (PW8) *C. diphtheriae* vaccine strain to produce the immunogenically reactive rDTB<sub>PW8</sub> using commercially available expression and purification systems.

### Material and Methods

#### Amplification and cloning of the *dtb* gene

The pQE30-DTB<sub>PW8</sub> construct was prepared as follows:

Correspondence: A.L. Mattos-Guaraldi, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Fax: +55-21-2587-6476. E-mail: guaraldi@pq.cnpq.br; guaraldi@uerj.br

Received September 29, 2009. Accepted April 6, 2010. Available online April 22, 2010. Published May 14, 2010.

genomic DNA extracted from the *C. diphtheriae* PW8 ATCC 13812 strain was used as a template for PCR amplification of the *dtb* gene using 5'- GGG ATC CTA GAA GGT AGC TCA TTG -3' as the forward primer and 5'- CCC GGG TGA CCC CAC TAC CTT TCA G -3' as the reverse primer. After purification with the Gene-Clean® gel extraction kit (BIO 101, USA), the *dtb* gene was cloned into the expression vector pQE-30™ of the QIAexpress System based on standard methods described by the manufacturer (Qiagen, USA).

#### Transformation of *E. coli* M15™ cells and expression of the *dtb* gene

The hexahistidine-tagged-fused DTB<sub>PW8</sub> protein was successfully expressed in competent *E. coli* M15™ cells. During this procedure, *E. coli* M15™ cells were transformed with the pQE-30/*dtb* construct and a selected transformant was grown for 12 h at 37°C in 300 mL Luria-Bertani medium containing 25 µg/mL ampicillin to 0.6 absorbance at 600 nm. Subsequently, transformants were induced with 0.2 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (Promega, USA) for 4 h, collected by centrifugation (10,000 g, 10 min, 4°C), resuspended in 2.0 mL lysis buffer [20 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, USA), 1 µg/mL lysozyme], and incubated for 1 h at 4°C. After 10X 10-s ultrasonic pulses, the suspension was centrifuged (10,000 g, 20 min, 4°C) and the clarified lysate added to a 2-mL suspension of a 50% Superflow Ni-NTA slurry and rotated overnight at 22°C. The mixture was transferred to a 5-mL gravity column and beads were washed twice with 4 mL washing buffer [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma)]. The protein was finally eluted with 4X 0.5 mL elution buffer [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, 8 M urea and 5 mM dithiothreitol (DTT; Sigma)] (16).

#### SDS-PAGE and densitometric analysis

The material eluted from the Ni-NTA column was analyzed by 12% SDS-PAGE under denaturing conditions (17). Fractions containing the highest concentration of rDTB<sub>PW8</sub> were dialyzed overnight against 5X PBS containing 0.3 M urea at 4°C. Protein concentration was determined using a BioRad Protein Assay™ Kit (USA), based on the method of Bradford, and densitometric analysis was performed with an Image Master 1-D densitometer (GE Healthcare, USA) as follows. The crude rDTB<sub>PW8</sub> preparation was chromatographed through a previously equilibrated affinity column containing a nickel streamline chelating matrix. Elution was performed using 20 mM Tris-HCl buffer containing 8 M urea, 0.5 M NaCl, 5 mM DTT and 0.5 M imidazole. The affinity chromatography fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE. The crude rDTB<sub>PW8</sub> preparation was also submitted to sieving exclusion chromatography on a Superdex 200 column (Pharmacia, USA) previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl. Effluent absorbing at 220 nm was combined and analyzed by SDS-PAGE as described (18,19).

#### Western blotting and localization of the heterologous protein in *E. coli* M15™ cells

Western blotting analysis of rDTB<sub>PW8</sub> fractions was performed using standard procedures (20). Proteins were blotted onto a 0.45-µm nitrocellulose membrane and blocked overnight with 5% skim milk/PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T). On the next day, the blocked membrane was incubated with 1:1000 mouse polyclonal antibody against the antiphtheria toxoid produced in house and then with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) diluted in PBS-T. Blots were further developed with nitroblue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (Sigma).

#### Immunization of mice and rabbits

Immunization experiments with rDTB<sub>PW8</sub> were conducted on 4- to 6-week-old male BALB/c mice and New Zealand rabbits in compliance with the Ethical Principles in Animal Experimentation established by the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Fundação Instituto Oswaldo Cruz - Animal Use Ethics Committee - CEUA (P0163-03) under protocol #CEUA L00034-07.

Mice (N = 5) were immunized intraperitoneally with 20 µg of the recombinant protein rDTB<sub>PW8</sub> in a 100-µL PBS (20%) emulsified in complete Freund's adjuvant. A booster was given 15 days after immunization. Blood samples were collected from the retro-orbital plexus before immunization and 15 and 60 days thereafter.

A New Zealand rabbit was immunized intradermally in the thigh with 2 µg rDTB<sub>PW8</sub> in 0.1-mL PBS supplemented with complete Freund's adjuvant and boosted with the same formulation 21 days later. Blood samples were collected from saphena or ear veins before challenge at 21 and 28 days thereafter.

#### Detection of rDTB<sub>PW8</sub>-specific antibodies by ELISA

ELISA was performed for the detection and quantification of both anti-rDTB<sub>PW8</sub> mouse and rabbit antibodies (21). Wells of Maxisorp plates were coated with 0.1 µg DT (Sigma) in 100 µL PBS. After overnight incubation at 4°C, microplates were washed with PBS-T, 100 µL goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1:4000) conjugated with horseradish peroxidase (both from Sigma) was added to each well and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After washing, reactions were observed 10 min after incubation at room temperature and in the absence of light with 10 mg/mL 3, 3',5,5' tetramethyl benzidine in 100 µL citrate phosphate buffer and 0.01% hydrogen peroxide as substrate. Finally, the reaction was stopped by the addition of 50 µL 2N sulfuric acid, and the absorbance at 450 nm of the yellow-orange color was measured with a spectrophotometer.

#### DT dermonecrotic neutralization test in rabbits

In order to evaluate the *in vivo* dermonecrotic neutralization potential of the recombinant DTB<sub>PW8</sub> protein

we used an adaptation of Fraser's protocol (22). Seven days after the booster dose with DTB<sub>PW8</sub>, an animal was challenged on the shaved back with injections of 0.1 mL bacterial supernatants adjusted to a concentration of approximately  $3 \times 10^8$  CFU toxigenic PW8 vaccine strain and nontoxigenic ATCC 27010 type strain. The efficacy of DT neutralization was monitored visually and sized when possible at the site of injection after 24, 48, and 120 h, for the absence or presence of dermoreactions to the bacterial challenges. Similarly, a non-immunized rabbit was also challenged on the shaved back with the supernatants of both bacterial strains.

## Results

### Amplification of the *dtb* gene of the *C. diphtheriae* PW8 vaccine strain by PCR

Following the purification step with the Gene-Clean Extraction kit the 1051-bp amplicon was cloned in frame within the *Bam*HI and *Sma*I restriction sites of the pQE-30™ expression vector to create a fusion product with the hexahistidine tag-coding sequence as shown in Figure 1A. Competent *E. coli* M15™ cells were successfully transformed with the ligation product and the details of the plasmid and the inserted DTB are presented in Figure 1B and C.

### Expression of the rDTB<sub>PW8</sub> recombinant protein

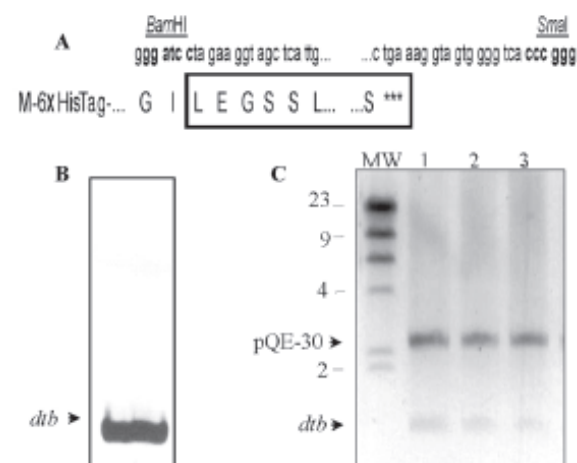
Expression of rDTB<sub>PW8</sub> recombinant protein in *E. coli* M15™ cells was demonstrated by SDS-PAGE and immunoblot analysis (Figure 2). The clarified rDTB<sub>PW8</sub> lysate was purified in one step using nickel-coated agarose beads and the eluted material was submitted to analysis by SDS-PAGE. A final protein concentration of 0.38 mg/mL was observed in the pool of rDTB<sub>PW8</sub>-containing fractions. rDTB<sub>PW8</sub> (lane 7) was recognized by anti-DT antibodies in Western blotting assays, confirming that the purified product was a fragment of DT protein.

### Densitometric analysis

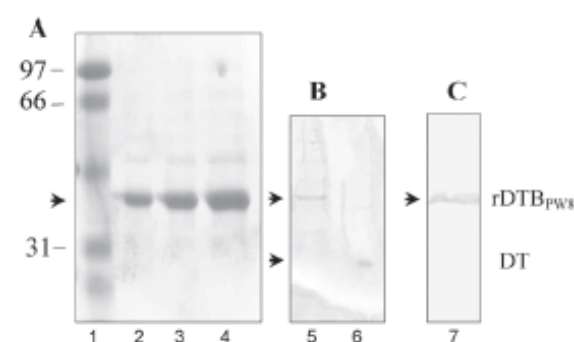
SDS-PAGE of the crude rDTB<sub>PW8</sub> preparation revealed various polypeptide bands suggestive of minor polypeptide contaminants. Densitometric analysis of these bands showed the relative abundance of each polypeptide as well as their estimated molecular weight (Figure 3A and B). As expected, the highest peak (84.8%) corresponded to the fraction containing the target protein rDTB<sub>PW8</sub>. On the other hand, we showed that Superdex-200 chromatography of the same preparation can be used prior to affinity chromatography columns and to improve the monitoring of the progress of the protein in the chromatograms. Such progress was indicated by the increase in intensity of the peptide peaks. The highest peak corresponded to the fraction containing the target protein rDTB<sub>PW8</sub> according to SDS-PAGE analysis (Figure 3C).

### Humoral immune response of mice and rabbits immunized with rDTB<sub>PW8</sub>

The results presented in Figure 4 indicate significant differences between the antigenic and immunogenic prop-



**Figure 1.** Amplification and cloning of the *Corynebacterium diphtheriae* Park Williams 8 (PW8) 1051-bp *dtb* gene. **A**, Restriction sites are indicated in bold and the translated amino acid sequences from the N-terminal to the C-terminal end are shown in upper case in a one-letter code; the DTB<sub>PW8</sub> amino acid sequence is boxed and the hexahistidine tag (HisTag) is shown as 6X HisTag. **B**, *dtb* gene from *C. diphtheriae* PW8 vaccine strain amplified by PCR. **C**, Agarose gel electrophoresis (0.8%) of three pQE-30 DTB<sub>PW8</sub> clones after digestion with *Bam*HI and *Sma*I. MW = molecular weight markers.



**Figure 2.** Expression of the B fragment of recombinant diphtheria toxin Park Williams 8 (rDTB<sub>PW8</sub>) in *Escherichia coli* M15™ cells. **A**, SDS-PAGE (12%) of fractions obtained during purification with Ni-NTA Superflow. Polypeptide bands were stained with the Coomassie brilliant blue R-350 reagent; Lane 1, MW = molecular weight markers; lane 2, flow-through fraction; lanes 3 and 4, wash fractions. **B**, Lane 5, eluted and dialyzed fraction; lane 6, diphtheria toxin (positive-control). **C**, Immunoblotting using mouse polyclonal antibody against the antidiphtheria toxoid produced in house (lane 7).

erties of rDTB<sub>PW8</sub> in mice (Figure 4A) and rabbits (Figure 4B). Both types of animal responded to the purified protein. However, while an antibody response of approximately 20

ELISA units/mL was observed in mice 60 days after immunization, a higher response (150 ELISA units/mL) was observed in rabbits starting at day 21 post-immunization.

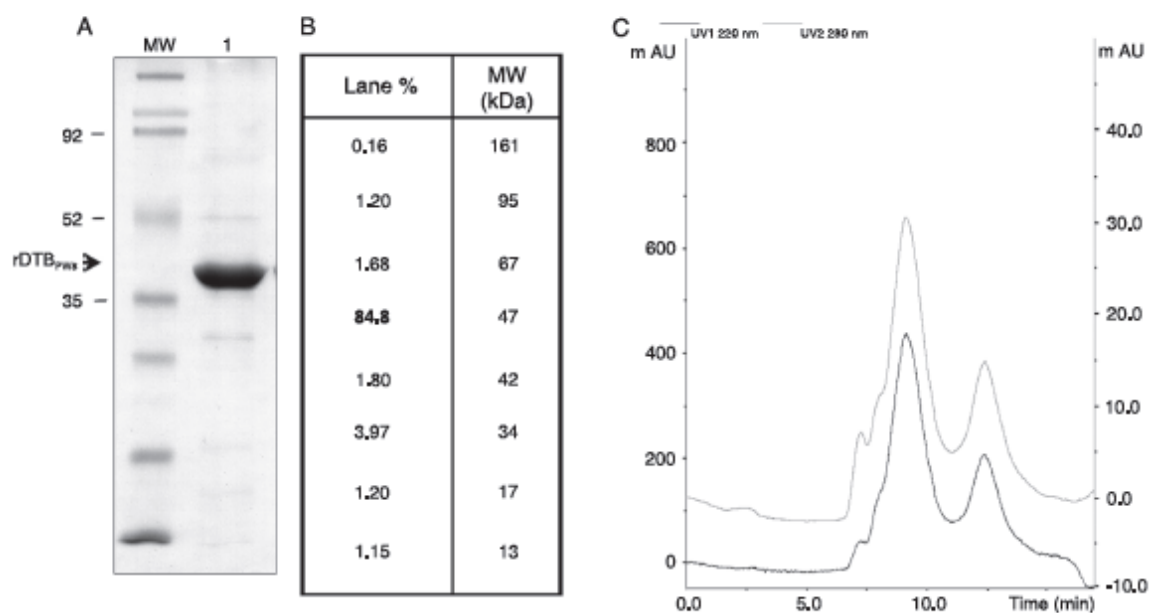


Figure 3. Densitometric analysis of recombinant diphtheria toxin Park Williams 8 (rDTBPW8) protein bands. A, SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue R-350. MW = molecular weight markers. B, Table displaying the relative abundance of polypeptide-stained bands and their estimated molecular mass. C, Crude preparation of diphtheric protein subunit B chromatographed onto Superdex-200. The highest peak with a molecular mass near 40 kDa corresponds to the fraction containing the target protein (rDTBPW8).

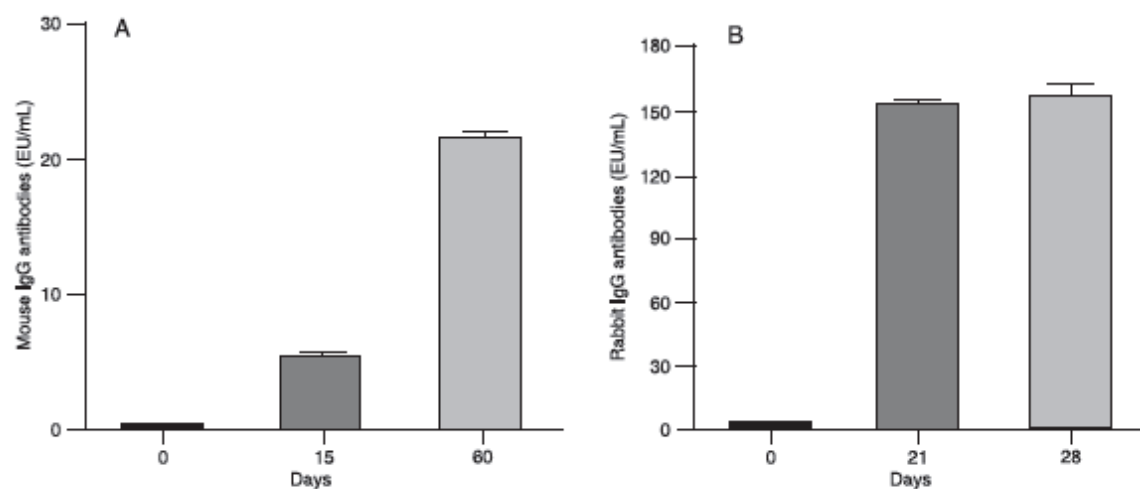
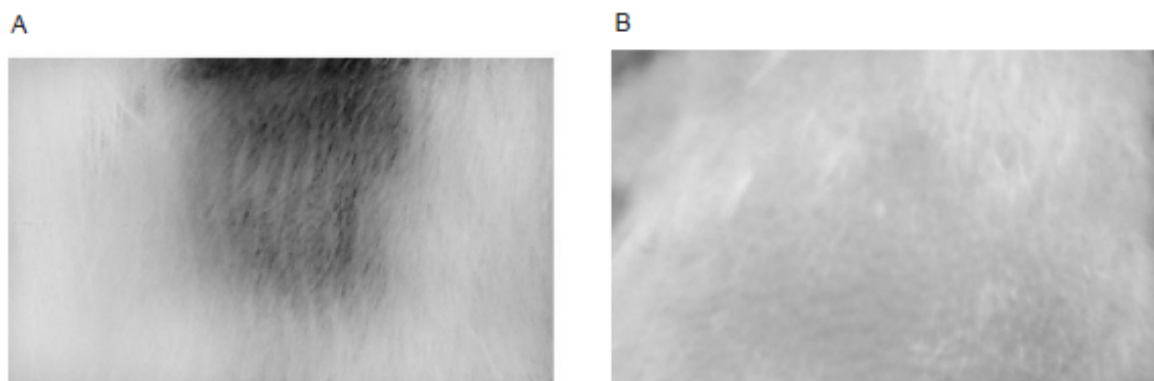


Figure 4. Antibody response of mice (N = 5) (A) and of a rabbit (N = 1) (B) after immunization with recombinant diphtheria toxin Park Williams 8 (rDTBPW8). Circulating IgG was measured by ELISA units/mL (EU/mL).



**Figure 5.** DT dermonecrotic neutralization test in rabbits immunized with rDTB<sub>PW8</sub>. A, At 120 h post-challenge with the supernatant of the toxigenic PW8 strain (approximately  $3 \times 10^8$  CFU), the readings over the shaved back of the non-vaccinated animal revealed an area of necrosis (up to 1 cm in diameter). B, The vaccinated animal remained unharmed and presented no more than a slight induration at the site of challenge.

The IgG response to the rDTB<sub>PW8</sub> protein was much stronger in the rabbit than in mice.

#### DT dermonecrotic neutralization test in rabbits immunized with rDTB<sub>PW8</sub>

The reading for the non-vaccinated animal at the site challenged with the toxigenic PW8 strain revealed a local of necrosis at 24 h, which increased up to 1 cm in diameter at 120 h, as illustrated in Figure 5A. On the other hand, the rabbit vaccinated with rDTB<sub>PW8</sub> (Figure 5B) remained unharmed after 120 h and presented no more than a slight induration at the site of the challenge with the virulent strain. As expected, no reactions were detected at the sites of injection with the non-virulent strain in either animal species. Animals were sacrificed 1 week after the challenge and no evidence of bacterial dissemination in their organs was detected.

## Discussion

In the present study, genomic DNA from the *C. diphtheriae* PW8 vaccine strain was used as a template for PCR amplification of the *dtb* gene. The amplicon obtained was sequenced and found to contain the entire B fragment DNA sequence from nucleotide 888 to 1939, as reported previously (23).

rDTB has been produced by different laboratories in the last few years (16,24). While Johnson et al. (24) used the pGEMEX expression plasmid from Promega™, Spilberg et al. (16) used the pET21d+ vector from Novagen™. However, neither group studied the neutralization potency of the immune response induced by DTB. In our study, we produced the DTB fragment using the pQE-30 expression vector from Quiagen™. The major feature of this system is the expression of the recombinant protein fused to a

hexahistidine tag, which is important for purification. In the present study, despite the high level of expression in *E. coli* M15™ the yield of the purified rDTB<sub>PW8</sub> was low (0.38 mg/mL) because most of the protein was insoluble (>70%). However, this yield can be improved by optimization of the production and purification protocols.

The densitometric analysis of the bands separated by electrophoresis of the crude rDTB<sub>PW8</sub> preparation showed, as expected, that the highest peak (84.8%) contained the target protein rDTB<sub>PW8</sub>. We also demonstrated for the same preparation that Superdex-200 chromatography can be used prior to affinity chromatography to improve the resolution of the target-protein in immobilized metal ion affinity chromatograph columns. Such progress was indicated by the increase in intensity of the peptide peaks.

The humoral immune response against rDTB<sub>PW8</sub> was evaluated in mice and rabbits by ELISA. Both species of animals responded to immunization with the DTB fragment; however, rabbits mounted a much stronger IgG antibody response than mice. In fact, it should be pointed out that in our study rabbits were immunized with ten times less antigen than mice. These results suggest that mice are less sensitive to the DT than rabbits. For this reason, we decided to evaluate the neutralization capacity of rDTB<sub>PW8</sub> in the rabbit model.

The first *in vivo* assay for the determination of the virulence of diphtheria bacilli was developed by Fraser (22) in 1931. The test is very sensitive and is based on the estimation of antitoxin levels on the skin of rabbits immunized or not with the antidiphtheritic vaccine and on the demonstration of the presence/absence of typical reactions at the site of injection of the bacterial challenge. Fraser's original assay was performed in rabbits and was recommended whenever results from the guinea pigs and Elek tests were negative (23). We also used rabbits to assay the

protective effect (neutralization) of rDTB<sub>PW8</sub> because, in addition to their ability to mount a superior IgG response after immunization with the purified B fragment, rabbits are much larger animals and therefore are more appropriate for the skin dermonecrotic neutralization test designed by Fraser. Our results demonstrated that the rabbit immunized with rDTB<sub>PW8</sub> was capable of mounting an effective neutralization response against the virulent challenge of the PW8 strain of *C. diphtheriae*, as opposed to the non-immunized animal and, consequently, that rDTB<sub>PW8</sub> is able to induce a potent neutralizing response against DT in immunized rabbits.

The present study has provided additional evidence about an alternative and accessible method for the expression and purification of the immunogenically reactive fragment B (rDTB<sub>PW8</sub>) of diphtheria toxin from the

*C. diphtheriae* PW8 vaccine strain using a commercially available expression system. More importantly, we also provide preliminary data about the protective potential of the DTB fragment against the challenge with toxigenic corynebacteria in rabbits.

## Acknowledgments

This study was carried out in partial fulfillment of the requirements of a PhD thesis for D.V. Nascimento, Faculdade de Ciências Médicas (PGCM), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Research supported by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, PAPES II/FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq, CAPES, Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX/MCT/CNPq), and Programa de Pós-Doutorado-PAPD (FAPERJ/CAPES).

## References

1. Pappenheimer AM Jr. Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 1977; 46: 69-94.
2. Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Junior R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world - an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 987-993.
3. Hansmeier N, Chao TC, Kalinowski J, Puhler A, Tauch A. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics* 2006; 6: 2465-2476.
4. Collier RJ. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 2001; 39: 1793-1803.
5. Collier RJ. Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors. *J Mol Biol* 1967; 25: 83-98.
6. Sandvig K, Olsnes S. Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH. Characterization of the entry process and effects of low pH on the toxin molecule. *J Biol Chem* 1981; 256: 9068-9076.
7. Sandvig K, Olsnes S. Diphtheria toxin-induced channels in Vero cells selective for monovalent cations. *J Biol Chem* 1988; 263: 12352-12359.
8. Stenmark H, Olsnes S, Sandvig K. Requirement of specific receptors for efficient translocation of diphtheria toxin A fragment across the plasma membrane. *J Biol Chem* 1988; 263: 13449-13455.
9. Stenmark H, Afanasiev BN, Ariansen S, Olsnes S. Association between diphtheria toxin A- and B-fragment and their fusion proteins. *Biochem J* 1992; 281 (Part 3): 619-625.
10. Zanen J, Muyldermans G, Beugnier N. Competitive antagonists of the action of diphtheria toxin in HeLa cells. *FEBS Lett* 1976; 66: 261-263.
11. Cabiaux V, Brasseur R, Wattiez R, Falmagne P, Ruyschaert JM, Goormaghtigh E. Secondary structure of diphtheria toxin and its fragments interacting with acidic liposomes studied by polarized infrared spectroscopy. *J Biol Chem* 1989; 264: 4928-4938.
12. Spilsberg B, Hanada K, Sandvig K. Diphtheria toxin translocation across cellular membranes is regulated by sphingolipids. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 465-473.
13. Yamaizumi M, Uchida T, Takamatsu K, Okada Y. Intracellular stability of diphtheria toxin fragment A in the presence and absence of anti-fragment A antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 461-465.
14. Papini E, Rappuoli R, Murgia M, Montecucco C. Cell penetration of diphtheria toxin. Reduction of the interchain disulfide bridge is the rate-limiting step of translocation in the cytosol. *J Biol Chem* 1993; 268: 1567-1574.
15. Cabiaux V, Phalipon A, Wattiez R, Falmagne P, Ruyschaert JM, Kaczorek M. Expression of a biologically active diphtheria toxin fragment B in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1988; 2: 339-346.
16. Spilsberg B, Sandvig K, Walchli S. Reconstitution of active diphtheria toxin based on a hexahistidine tagged version of the B-fragment produced to high yields in bacteria. *Toxicon* 2005; 48: 900-906.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
18. Wang H, Del Grosso AV, May JC. Determination of benzenonium chloride in anthrax vaccine adsorbed by HPLC. *Biologicals* 2006; 34: 257-263.
19. Azarkan M, Huet J, Baeyens-Volant D, Looze Y, Vandebussche G. Affinity chromatography: a useful tool in proteomics studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 849: 81-90.
20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354.
21. Gor DO, Ding X, Li Q, Greenspan NS. Genetic fusion of three tandem copies of murine C3d sequences to diphtheria toxin fragment B elicits a decreased fragment B-specific antibody response. *Immunol Lett* 2006; 102: 38-49.
22. Fraser DT. The technique of a method for the quantitative determination of diphtheria antitoxin by a skin test in rabbits. *Transact Royal Soc Canada* 1931; 5: 175-181.

- 
23. Ratti G, Rappuoli R, Giannini G. The complete nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxin in the *Corynebacterium phage omega* (tox+) genome. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 6589-6595.
24. Johnson N, Pickett MA, Watt PJ, Clarke IN, Heckels JE. Construction of an epitope vector utilising the diphtheria toxin B-subunit. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 146: 91-96.



### 3.2 Artigo 2 - Plasmid instability when the *hsp60* gene promoter is used to express the protective non-toxic fragment B of the diphtheria toxin in recombinant BCG

**Artigo 2:** Plasmid instability when the *hsp60* gene promoter is used to express the protective non-toxic fragment B of the diphtheria toxin in recombinant BCG.

**Autores:** Dilzamar V. Nascimento, Odir A. Dellagostin, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Geraldo M. B. Pereira, Raphael H. Junior, Geraldo R. Garcia Armôa.

**Revista:** Amer J Mol Biol 2013; 3, 81-86. (Qualis B4)

#### RESUMO

A vacina clássica toxoide diftérico contra difteria tem sido utilizado com grande sucesso por décadas e é universalmente reconhecida como uma das ferramentas mais importantes para a prevenção da difteria. No entanto, a vacina atual não pode ser administrada em dose única devido à sua reatogenicidade devido à presença de proteínas contaminantes geradas durante o processo de produção da toxina diftérica (DT). Uma alternativa menos onerosa para as novas vacinas DTP para os países do terceiro mundo poderia ser o desenvolvimento de uma vacina mais segura e menos reatogênica através da modificação da cepa viva atenuada de *M. bovis* BCG, uma vacina amplamente utilizada contra a tuberculose. A estabilidade da expressão de antígenos heterólogos em BCG, no entanto, depende da compatibilidade genética entre o cassete de expressão; da construção do plasmídeo e da cepa de BCG hospedeira. Neste artigo nós descrevemos a instabilidade de uma construção plasmidial carregando o promotor micobacteriano *Hsp60*, desenvolvido para expressar o gene *dtb* de *C. diphtheriae* que codifica o fragmento B da toxina diftérica em BCG.

Palavras-chave: vacina BCG, BCG recombinante, fragmento B da toxina diftérica, vacina antidiftérica.

## Plasmid instability when the *hsp60* gene promoter is used to express the protective non-toxic fragment B of the diphtheria toxin in recombinant BCG

Dilzamar V. Nascimento<sup>1</sup>, Odir A. Dellagostin<sup>2</sup>, Raphael Hirata Jr.<sup>1</sup>, Geraldo M. B. Pereira<sup>1,3</sup>, Ana Luiza Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>, Geraldo R. Garcia Armôa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Pelotas, Brazil

<sup>3</sup>Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Email: [guaraldi@pq.cnpq.br](mailto:guaraldi@pq.cnpq.br), [guaraldi@uerj.br](mailto:guaraldi@uerj.br)

Received 30 August 2012; revised 1 March 2013; accepted 25 April 2013

Copyright © 2013 Dilzamar V. Nascimento *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### ABSTRACT

The genetic modification of the live attenuated *Mycobacterium bovis* BCG to deliver a protective *Corynebacterium diphtheriae* antigen *in vivo* could be a safer and less costly alternative to the new and more expensive DTP vaccines available today, in particular to third world-countries. The stability of expression of heterologous antigens in BCG, however, is a major challenge to the use of live recombinant bacteria in vaccine development and appears to be dependent to a certain extent, on a genetic compatibility between the expression cassette within the plasmid construct and the mycobacterium host. In the quest for the best recombinant BCG transformant to express the *dtb* gene of *C. diphtheriae* we generated two new rBCG strains by transforming the Moreau substrain of BCG with the mycobacterial expression vectors pUS973 and pUS977, each one carrying a different promoter to drive the expression of the target antigen. After transformation recombinant BCG clones were selected on Middlebrook 7H10 kanamycin Agar plates, expanded in Middlebrook 7H9 kanamycin Broth and analyzed by agarose gel electrophoresis and immunoblotting. rBCGs transformed with the construct carrying the weak *P<sub>AN</sub>* promoter from *M. paratuberculosis* stably expressed the *dtb* gene. Conversely, rBCGs transformed with the construct carrying the strong mycobacterium *hsp60* promoter were unstable and consequently unfit for the expression of the *C. diphtheriae* gene.

**Keywords:** BCG Vaccine; Recombinant BCG; Fragment B of Diphtheria Toxin; Anti-Diphtheria Vaccine

### 1. INTRODUCTION

Diphtheria, the classical disease caused by *C. diphtheriae* is an acute communicable infection of the upper respiratory tract that can be fatal [1,2]. Although the global incidence of diphtheria has been reduced dramatically as a result of increased vaccine coverage, infections by different biotypes of *C. diphtheriae* continue to be reported in many countries [3,4]. The diphtheria toxin (DT) is a polypeptide with a molecular weight of about 58,000 Daltons that is cleaved into two fragments to become active. The fragment A (DTA) with 193 amino acids is an enzyme that catalytically inactivates the ribosomal elongation factor-2 of eukaryotic cells while the 342 amino acids long fragment B (DTB) recognizes and binds to specific receptors on the surface of most eukaryotic cells, facilitating the translocation of the fragment A across the membrane [5]. Despite the existence of a very good toxoid vaccine, diphtheria has not been eradicated yet. On the other hand, the current toxoid based vaccine presents risks to vaccinees associated to the production process. These risks include incomplete inactivation and the presence of reactor and unknown proteins generated during the inactivation process. For this reason the immunization against diphtheria has to be done with three doses to minimize adverse effects that could take place with a full single dose [6,7]. Adverse side reactions of that kind could be easily avoided by purification of the current vaccine. However, the purification of the diphtheria toxoid would increase the cost of production considerably.

The Bacillus of Calmette-Guérin (BCG), a live attenuated substrain of *M. bovis* obtained almost a century ago, is currently the only vaccine licensed against TB world wide. The recombinant BCG approach developed

on top of it emerged in the late 80's as a creative technology for *in vivo* delivery of protective antigens and brought a new hope for the development of low cost multivalent vaccines [8,9]. In this context, a genetically modified BCG strain expressing a relevant diphtheria antigen could be a safer alternative to the current classic vaccine used against diphtheria in places where BCG is mandatory. Nevertheless, the stability of the expression of heterologous antigens in BCG is still a major issue and perhaps one of the most important obstacles to the use of this technology in vaccine development. In fact there are several reports in the literature showing that genetic rearrangements lead to the disruption of the expression of heterologous genes or promoters in mycobacteria [10-14]. In this paper, we report our first results over the expression of the *C. diphtheriae* gene *dtb<sub>PW8</sub>* by the *M. bovis* BCG substrain Moreau used in Brazil to produce the vaccine against TB, modified by the transformation with distinct plasmid vectors, pUS973 and pUS977, to generate two new recombinant strains in which the expression of the target gene is driven by a strong (*hsp60*) or a weak (*P<sub>AD</sub>*) mycobacterium promoter. A comparison of the structural stability of plasmid constructs used to transform BCGs with constructs rescued after transformation and growth of the two rBCGs in culture medium are presented.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial Strains and Media

The toxigenic strain of *C. diphtheriae* Park Williams 8 (ATCC 13812) was used as the source of genomic DNA, while the *Escherichia coli* DH5a strain was used for amplification of all plasmid vectors. *C. diphtheriae* was grown in Brain Heart Infusion broth and *E. coli* in Luria-Bertani broth or agar plates with or without ampicillin (75 µg/mL). The BCG vaccine (*M. bovis* BCG, Moreau substrain) was provided by the Brazilian National producer Fundação Athaulpho de Paiva in Rio de Janeiro, RJ [15] and was typically grown at 37°C in Middlebrook 7H9 or 7H10 medium supplemented with ADC (Difco Laboratories) plus kanamycin 25 µg/mL, when needed.

### 2.2. Construction of Mycobacterial Expression Vectors Carrying the *dtb* Gene

The DNA fragment corresponding to the *dtb<sub>PW8</sub>* gene was amplified from the *C. diphtheriae* genomic DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers *dtb* F (5'CGTCTAGAAGGTAGCTCATTGTC3') and *dtb* R (5'GCTCTAGACCCCACTACCTTTC3') designed from the sequence encoding the diphtheria toxin, GenBank accession code K01722 [16]. The PCR reaction was performed in the Gene Amp PCR System 2400 thermo cycler (Perkin Elmer) with 30 cycles of 5 minutes de-

naturation at 94°C, 1.5 minutes annealing at 55°C and 2 minutes extension at 50°C. The PCR product was analyzed in agarose gel and the 1051 bp amplicon band corresponding to the size of the *dtb<sub>PW8</sub>* DNA was purified, digested with *Xba*I and then cloned into the same site of the expression vectors pUS973 and pUS977 [17, 18], giving rise to pUS973*dtb<sub>PW8</sub>* and pUS977*dtb<sub>PW8</sub>* constructs, respectively. The identity of the DNA inserts was confirmed by DNA sequencing.

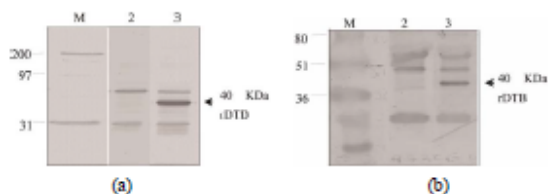
### 2.3. Transformation of BCG, Analysis of rBCG Clones for Expression of *dtb<sub>PW8</sub>* and Plasmid Integrity

The Moreau BCG was transformed with pUS973*dtb<sub>PW8</sub>* or pUS977*dtb<sub>PW8</sub>*, or with an empty plasmid, by electroporation. In order to do this BCG was grown to an optical density of 600 nm in Middlebrook 7H9 broth, centrifuged twice at 4000 × g for 10 minutes and resuspended to 1/20 of its original volume in 10% glycerol. Further, 200 microliters of BCG were mixed with each plasmid DNA construct (1 - 2 µg) in a pre-chilled 0.2 cm electroporation cuvette (Bio-Rad) and transformation was performed using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad) at 2.5 kV, 1000 Ω and 25 µF [19]. Recombinant BCG clones were selected after 14 - 21 days of incubation at 37°C on Middlebrook 7H10 agar plates containing kanamycin, expanded in Middlebrook 7H9 broth with kanamycin at 37°C and 2.0 mL aliquots of each culture were harvested at mid-log growth phase, lysed and subjected to 12% SDS-PAGE. After separation in the SDS gel, proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, California) and subjected to immunoblotting analyses to detect the expression of the DTB protein using mice anti-toxoid polyclonal antibodies (1:5000 dilution), according to standard procedures described in our previous studies [16]. Recombinant BCG clones were also analyzed with regards to plasmid integrity to confirm the presence of the *dtb<sub>PW8</sub>* gene by restriction analyses with *Xba*I of plasmids recovered from rBCG expressing *dtb<sub>PW8</sub>*, or not [20].

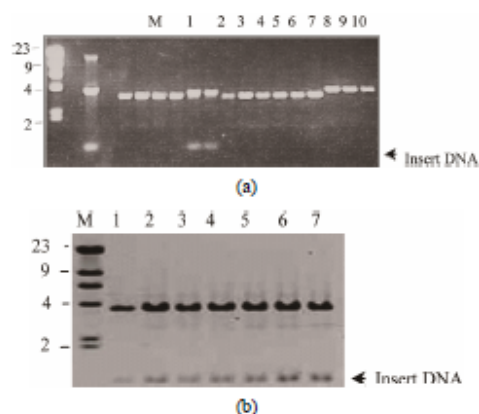
## 3. RESULTS

A 1051 bp long DNA fragment, named *dtb<sub>PW8</sub>*, necessary to build the expression vectors used in this study to modify BCG was successfully amplified by PCR from the genome of the *C. diphtheriae* PW8 vaccine strain, using specific primers designed to do it as referred above. The identity of the *dtb<sub>PW8</sub>* gene was confirmed by DNA sequencing and analysis of similarity against the sequence of DT deposited in the GenBank. The gene *dtb* was further cloned into the extrachromosomal mycobacterial expression vectors pUS973 and pUS977 generating constructs pUS973*dtb<sub>PW8</sub>* and pUS977*dtb<sub>PW8</sub>*, respec-

tively, and these were used to transform BCG. The two new rBCG strains resulting from transformation were evaluated in terms of their capacity to express rDTB<sub>PWS</sub> *in vitro*. The only difference between vectors pUS973 and pUS977 is the promoter sequence used to drive the expression of the foreign gene. The pUS973 vector carries the strong constitutive *hsp60* promoter from *M. tuberculosis*, while pUS977 carries the *P<sub>AN</sub>* promoter from *M. paratuberculosis*. The expression of DTB in rBCG was evaluated by immunoblotting assays using polyclonal antibodies against the diphtheria toxin. As predicted, a band of the expected size for DTB, 40 kDa, was recognized in lysates of rBCGpUS973dtb<sub>PWS</sub> or rBCGpUS977dtb<sub>PWS</sub> subjected to immunoblot analysis. The level of expression of rDTB<sub>PWS</sub> observed in BCG transformed with pUS973dtb<sub>PWS</sub> was similar to BCG transformed with pUS977dtb<sub>PWS</sub> (Figures 1(a) and (b)). Mycobacteria and corynebacteria have a common ancestry and may as well share antigens. This fact possibly contributed to the fact that the use of polyclonal antibodies in the immunoblotting assays led to the visualization of non-specific rest bands in both non-transformed and transformed BCG. In order to verify the structural stability of the recombinant plasmids, selected BCG transformants were subjected to two successive passages in 7H9 Middlebrook medium supplemented with kanamycin. Subsequently, plasmid DNA was recovered by electrotransformation into *E. coli* [20]. Several colonies were selected and the purified plasmid DNA was digested with *Xba*I. Electrophoresis of the digested DNA revealed that most BCG clones transformed with pUS973dtb<sub>PWS</sub> had undergone mutations (Figure 2(a)), whereas none of the pUS977dtb<sub>PWS</sub> clones showed alteration in the structure of the plasmid (Figure 2(b)). In fact, a few constructs from rBCGpUS973dtb<sub>PWS</sub> (Figure 2(a), lanes 2-5) lost the *Xba*I site and part of the plasmid DNA since they exhibited a lower molecular mass when compared to the original vector (lanes 8-10) used as control. Also, other constructs recovered from clones of the same rBCGpUS973dtb<sub>PWS</sub> strain apparently lost part of their



**Figure 1.** Immunoblotting analysis of rBCGpUS973dtb<sub>PWS</sub> and rBCGpUS977dtb<sub>PWS</sub> cell lysates. (a) lane M: molecular weight markers; lane 2: non-modified BCG lysate; lane 3: rBCGpUS973dtb<sub>PWS</sub> lysate; (b) lane M: molecular weight markers; lane 2: non-modified BCG; lane 3: rBCGpUS977dtb<sub>PWS</sub> lysate. The arrows at the right of gels indicate a band of the expected size for rDTB.



**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis analysis of pUS973dtb<sub>PWS</sub> and pUS977dtb<sub>PWS</sub> constructs recovered from rBCGpUS973dtb<sub>PWS</sub> and rBCGpUS977dtb<sub>PWS</sub> clones after digestion with *Xba*I. (a) lane M: DNA markers ( $\lambda$  HindIII); lane 1: pUS973dtb<sub>PWS</sub>. The top band corresponded to an artifact resulting of the non-digested plasmid applied in excess on the gel. the two lower bands corresponded to the linearized pUS973 plasmid (middle band) and the excised insert (lowest band); lanes 2-7: pUS973dtb<sub>PWS</sub> clones; lanes 8-10: empty pUS973; (b) lane M: DNA markers; lane 1: pUS977dtb<sub>PWS</sub>; lanes 2-7: pUS977dtb<sub>PWS</sub> clones. the arrows at the right of gels indicate the DNA insert liberated after digestion.

DNA in spite of having released the insert (lanes 6 and 7). Indeed, the instability of constructs based on the *hsp60* promoter is not new. It has been shown that mutations may occur as a result of modifications of the promoter or insert sequences [13]. What is new is that it also occurs with the dtb<sub>PWS</sub> gene from *C. diphtheriae*.

#### 4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The genetic modification of the BCG vaccine as an approach to the development of new multivalent vaccines has been actively pursued ever since it was proposed in 1989 [8] and has been the focus of our research over the last years [21-28]. BCG is a powerful candidate to a multivalent vaccine platform. We successfully constructed a new and stable rBCG strain able to express the non-toxic fragment B of the *C. diphtheriae* toxin by genetically modifying the Moreau substrain of BCG used in the production of the vaccine against TB in Brazil. Although a mutant of the DT, CRM197, has been expressed in BCG using the promoter pBlaf [29], this is the first clear demonstration that the safer B fragment of DT can be expressed and well tolerated by BCG. These are definitive conditions for the development of vaccine prototypes based on this technology since not every antigen is necessarily expressed or tolerated by BCG. Our best results came out with the BCG transformed with the

pUS977*dtb*<sub>PWS</sub> construct in which the expression of DTB is driven by the *P*<sub>AN</sub> promoter, a regulatory sequence derived from *M. paratuberculosis*. The *P*<sub>AN</sub> sequence, a weak mycobacterial promoter [18], has been successfully used by others for the expression of the  $\alpha$ -galactosidase of *E. coli* [30], the LacZ of *E. coli* [31], the Gp63 surface antigen of *Leishmania* [32], the Nef antigen of Simian Immunodeficiency Virus [33], the Nef, Gag, Env antigens of Simian Immunodeficiency Virus [34], the S1 subunit of the *Bordetella pertussis* toxin [24], the hepatitis B surface antigens [35] and the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* [28]. In our study all rBCGpUS977*dtb*<sub>PWS</sub> clones stably expressed significant amounts of DTB while rBCGpUS973*dtb*<sub>PWS</sub> clones were unstable and, consequently, unsuitable for DTB expression. Both *hsp60* and *P*<sub>AN</sub> are constitutive mycobacterial promoters and have been widely used in recombinant BCG studies [18, 35,36]. The reason for the instability of rBCGs transformed with the pUS973 construct designed with the stronger *hsp60* promoter is not yet clear and was not the objective of this study. However, it is known that the expression of heterologous antigens in recombinant BCG essentially imposes a metabolic burden with an unpredictable outcome and also, although not frequent in mycobacteria, the modification of the *hsp60* promoter may result from a recombination event between host and plasmid sequences [11]. Consequently, the foreign gene expression driven by the *hsp60* promoter is not always feasible in BCG [11,37]. The *hsp60* promoter has a much stronger activity when compared to the *P*<sub>AN</sub> promoter and this may result in a more stressful metabolic scenario for the host cell, which in turn may select point mutations or deletions in the *hsp60* promoter region disrupting the expression of the heterologous protein. In fact, there may be a lethal level of synthesis of the foreign protein followed by selection of mutants with deletion in the promoter region immediately after induction of the *hsp60* promoter in the transformed host [13]. Based on the preliminary data presented here we believe that the recombinant BCG expressing the rDTB<sub>PWS</sub> polypeptide under the *P*<sub>AN</sub> promoter can be further exploited for the development of a vaccine prototype as an alternative for the current vaccine against diphtheria. We showed that *P*<sub>AN</sub> promoter was expressed continuously *in vitro* during intracellular growth of *M. bovis* BCG, and basically all rBCGpUS977*dtb*<sub>PWS</sub> clones stably expressed the non-toxic fragment B of the diphtheria toxin. On the other hand, the pUS973, a similar expression vector based on the use of a heat shock protein promoter (*hsp60*) was highly unstable and inadequate for expression of the *dtb*<sub>PWS</sub> gene.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out in partial fulfillment of the requirements of a

PhD thesis for Dilzamar V. Nascimento, Faculdade de Ciências Médicas (PGCM), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Research supported by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, PAPER II/FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq, CAPES, Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX/MCT/CNPq).

## REFERENCES

- [1] Kimura, Y., Watanabe, Y., Suga, N., Suzuki, N., Maeda, K., Suzuki, K., Kitagawa, W., Miura, N., Morita, Y. and Imai, I. (2011) Acute peritonitis due to *Corynebacterium ulcerans* in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis: A case report and literature review. *Clinical and Experimental Nephrology*, 15, 171-174. doi:10.1007/s10157-010-0346-4
- [2] Viguetti, S.V., Pacheco L.G.C., Santos, L.S., Soares, S.C., Bolt, F., Baldwin, A., Dowson, C.G., Rosso, M.L., Guiso, N., Miyoshi, A., Hirata Jr., R., Mattos-Guaraldi, A.L. and Azevedo, V. (2012) Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Rio de Janeiro urban area, Brazil. *Epidemiology and Infection*, 140, 617-620. doi:10.1017/S0950268811000963
- [3] Mattos-Guaraldi, A.L., Moreira, L.O., Damasco, P.V. and Hirata Jr., R. (2003) Diphtheria remains a threat to health in developing world—An overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 987-993. doi:10.1590/S0074-02762003000800001
- [4] Wagner, K.S., White, J.M., Neal, S., Crowcroft, N.S., Kupreviciene, N., Paberza, R., Lucenko, I., Joks, U., Akbas, E., Alexandrou-Athanassoulis, H., Detcheva, A., Vuopio, J., von Hunolstein, C., Murphy, P.G., Andrews, N., Members of the Diphtheria Surveillance Network (DIPNET) and Efstratiou, A. (2011) Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007-2008: A multicentre European study. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 519-525. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03269.x
- [5] Pappenheimer Jr., A.M. (1977) Diphtheria toxin. *Annual Review of Biochemistry*, 46, 69-94. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.000441
- [6] Uchida, T. (1983) Diphtheria toxin. *Pharmacology Therapeutics*, 19, 107-122. doi:10.1016/0163-7258(82)90043-2
- [7] Johnson, V.G. and Nicholls, P.J. (1994) Identification of a single amino acid substitution in the diphtheria toxin A chain of CRM 228 responsible for the loss of enzymatic activity. *Journal Bacteriology*, 176, 4766-4769.
- [8] Jacobs Jr., W.R., Snapper, S.B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R.E., Kieser, T. and Bloom, B.R. (1989) Development of genetic systems for mycobacteria. *ACTA Leprologica*, 1, 203-207.
- [9] Bastos, R.G., Borsuk S., Seixas, F.K. and Dellagostin, A.O. (2009) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine*, 27, 6495-6503. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.044
- [10] Summers, D.K. (1993) Stability of genetic material in prokaryotes. *Biologicals*, 21, 91-93.

- [doi:10.1006/biol.1993.1053](https://doi.org/10.1006/biol.1993.1053)
- [11] Haeseleer, F. (1994) Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria. *Research in Microbiology*, **145**, 683-687. [doi:10.1016/0923-2508\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90040-X)
- [12] Kumar, D. (1998) Genetic rearrangements leading to disruption of heterologous gene expression in mycobacteria: An observation with *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium smegmatis* and its implication in vaccine development. *Vaccine*, **16**, 1212-1215. [doi:10.1016/S0264-410X\(98\)80121-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)80121-7)
- [13] Al-Zarouni, M. and Dale J.W. (2002) Expression of foreign genes in *Mycobacterium bovis* BCG strains using different promoters reveals instability of the *hsp60* promoter for expression of foreign genes in *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Tuberculosis (Edinb)*, **82**, 283-291. [doi:10.1054/tube.2002.0374](https://doi.org/10.1054/tube.2002.0374)
- [14] Joseph, J., Lloris, R.F., Pezzat, E., Saubi, N., Cardona, P. J., Mothe, B. and Gatell, J. M. (2010) Molecular characterization of heterologous HIV-1 gp 120 gene expression disruption in *Mycobacterium bovis* BCG host strain: A critical issue for engineering mycobacterial based vaccine vectors. *Journal of Biomedicine Biotechnology*, **2010**, 1-10. [doi:10.1155/2010/357370](https://doi.org/10.1155/2010/357370)
- [15] Benévolo-de-Andrade, T.C., Monteiro-Maia, R., Cosgrove, C. and Castello-Branco, L.R. (2005) BCG Moreau Rio de Janeiro an oral vaccine against tuberculosis review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 459-465. [doi:10.1590/S0074-02762005000500002](https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000500002)
- [16] Nascimento, D.V., Lemes, E.M.B., Queiroz, J.L.S., Silva Jr., J.G.S., Nascimento, H.J., Silva, E.D., Hirata Jr., R., Dias, A.A.S.O., Santos, C.S., Pereira, G.M.B., Mattos-Guaraldi, A.L. and Armoa, G.R.G. (2010) Expression and purification of The immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 *Corynebacterium diphtheriae* strain toxin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **43**, 409-521. [doi:10.1590/S0100-879X2010007500032](https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500032)
- [17] da Cruz, F.W., McBride, A.J.A., Conceição, F.R., Dale, J.W., McFadden, J. and Dellagostin, O.A. (2002). Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the Rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of a humoral response in mice. *Vaccine*, **20**, 731-736. [doi:10.1016/S0264-410X\(01\)00414-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00414-5)
- [18] Medeiros, M.A., Dellagostin, O.A., Armôa, G.R., Degraive, W.M., De Mendonça-Lima, L., Lopes, M.Q., Costa, J.F., McFadden, J. and McIntosh, D. (2002) Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. *Microbiology*, **148**, 1999-2009.
- [19] Parish, T. and Stoker, N.G. (1995). Electroporation of mycobacteria. *Methods Molecular Biology*, **1**, 237-252.
- [20] Baulard, A., Jourdan, C., Mercenier, A. and Loch, C. (1992) Rapid Mycobacterial plasmid analysis by electrotransformation between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, **20**, 4105. [doi:10.1093/nar/20.15.4105](https://doi.org/10.1093/nar/20.15.4105)
- [21] Dellagostin, O.A., Wall, S., Norman, E. O'Shaughnessy, T., Dale, J.W. and McFadden, J. (1993) Construction and use of integrative vectors to express foreign antigens in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, **10**, 983-993. [doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00970.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00970.x)
- [22] Dellagostin, O.A., Esposito, G., Eales, L.J., Dale, J.W. and McFadden, J. (1995) Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. *Microbiology*, **141**, 1785-1792. [doi:10.1099/13500872-141-8-1785](https://doi.org/10.1099/13500872-141-8-1785)
- [23] Varaldo, P.B., Leite, L.C., Dias, W.O., Miyaji, E.N., Torres, F.I., Gebara, V.C., Armôa, G.R., Campos, A.S., Winter, N., Gicquel, B., Vilar, M.M., MacFadden, J., Almeida, M.S., Tendler, M. and McIntosh, D. (2004) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sml4 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infection and Immunity*, **72**, 3336-3343. [doi:10.1128/IAI.72.6.3336-3343.2004](https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3336-3343.2004)
- [24] Medeiros, M.A., Armôa, G.R., Dellagostin, O.A. and McIntosh, D. (2005) Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**, 1015-1020. [doi:10.1139/w05-095](https://doi.org/10.1139/w05-095)
- [25] Michelon, A., Conceição, F.R., Binsfeld, P.C., da Cunha, C.W., Moreira, A.N., Argondizzo, A.P., McIntosh, D., Armôa, G.R., Campos, A.S., Faber, M., McFadden, J. and Dellagostin, O.A. (2006) Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Anaplasma marginale* MSP1a antigen. *Vaccine*, **11**, 6332-6339. [doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.028](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.028)
- [26] Varaldo, P.B., Miyaji, E.N., Vilar, M.M., Campos, A.S.D., Dias, W.O., Armôa, G.R., Tendler, M., Leite, L.C. and McIntosh, D. (2006) Mycobacteria codon optimization of the gene encoding the Sml4 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances expression but not protection against cercarial challenge in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **48**, 132-139. [doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00133.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00133.x)
- [27] Santangelo, M.P., McIntosh, D., Bigi, F., Armôa, G.R., Campos, A.S.D., Ruybal, P., Dellagostin, O.A., McFadden, J., Mendum, T., Gicquel, B., Winter, N., Farber, M. and Cataldi, A. (2007) *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*. *Vaccine*, **25**, 1104-1113. [doi:10.1016/j.vaccine.2006.09.069](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.069)
- [28] Seixas, F.K., Silva, E.F., Hartwig, D.D., Cerqueira, G.M., Amaral, M., Fagundes, Q., Dossa, R.G. and Dellagostin, O.A. (2007) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine*, **26**, 88-95. [doi:10.1016/j.vaccine.2007.10.052](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.052)
- [29] Miyaji, E.N., Mazzantini, R.P., Dias, W.O., Nascimento, A.L., Marcovistz, R., Matos, D.S., Raw, I., Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R. and Leite, L.C. (2001) Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant CRM197, a mutant diphtheria toxin. *Infection and Immunity*, **69**, 869-874. [doi:10.1128/IAI.69.2.869-874.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.869-874.2001)
- [30] Murray A., Winter, N., Lagranderie, M., Hill, D.F., Raugier, J., Tumm, J., Leclerc, C., Gheorghiu, K.M. and Gicquel, B. (1992) Expression of *Escherichia coli* beta ga-

- lactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Molecular Microbiology*, 6, 3331-3342. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02201.x
- [31] Lagranderie, M., Murray, A., Gicquel, B., Leclerc, C. and Gheorghiu M. (1993) Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. *Vaccine*, 11, 1283-1290. doi:10.1016/0264-410X(93)90096-G
- [32] Abdelhak, S., Louzir, H., Tumm, J., Blel, L., Benlasfar, Z., Lagranderie, M., Gheorghiu, M., Dellagi, K. and Gicquel, B. (1995) Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/C mice. *Microbiology*, 141, 1585-1592. doi:10.1099/13500872-141-7-1585
- [33] Winter, N., Lagranderie, M., Gangloff, S., Leclerc, C., Gheorghiu, M. and Gicquel, B. (1995). Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251 nef gene Induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine*, 13, 471-478. doi:10.1016/0264-410X(94)00001-4
- [34] Mederle, I., Le Grand, R., Vaslin, B., Badell, E., Vingert, B. and Dormont, G. (2003) Mucosal administration of three recombinant *Mycobacterium bovis* BCG-SIVmac251 strains to cynomolgus macaques induces rectal IgAs and boosts systemic cellular immune responses that are primed by intradermal vaccination. *Vaccine*, 21, 4153-4166. doi:10.1016/S0264-410X(03)00537-1
- [35] Rezende, C.A.F., De Moraes, M.T.B., Matos, D.C.S., McIntosh, D. and Armôa, G.R.G. (2005) Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens. *Journal of Virological Methods*, 125, 1-9. doi:10.1016/j.jviromet.2004.11.026
- [36] Stover, C.K., Bansal, G.P., Hanson, M.S., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R. and Young, J.F. (1993) Protective immunity elicited by recombinant bacilli Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: A candidate Lyme disease vaccine. *Journal Experimental Medicine*, 178, 197-209. doi:10.1084/jem.178.1.197
- [37] Fan, X.-Y., Ma, H., Guo, J., Li, Z.-M., Cheng, Z.-H., Guo, S.-Q. and Zhao, G.-P. (2009) A novel differential expression system for gene modulation in mycobacteria. *Plasmid*, 61, 39-46. doi:10.1016/j.plasmid.2008.09.002

### 3.3 Artigo 3: *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the *dtb* gene antigen from diphtheria toxin

**Artigo 3:** *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the *dtb* gene antigen from diphtheria toxin.

**Autores:** Dilzamar V. Nascimento, Odir A. Dellagostin, Denise C. S. Matos, McIntosh D, Raphael Hirata Jr, Geraldo M. B. Pereira, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Geraldo R.G. Armôa.

**(Redação final para submissão)**

#### RESUMO

A difteria é uma doença bacteriana de evolução fulminante causada por cepas de *C. diphtheriae* toxigênicas, cujas manifestações locais e sistêmicas são basicamente pela ação da toxina diftérica (DT). A vacina contra a difteria usado no mundo inteiro é um toxóide obtido por detoxificação da toxina diftérica administrado em combinação com o toxoide tetânico e a vacina pertussis celular (DTP). Embora associado com alta eficácia na prevenção da doença a vacina contra a difteria pode apresentar alguns problemas tais como toxicidade e reatogenicidade, resultante da presença de contaminantes na vacina como proteínas agregadas no processo de produção ou de detoxificação. Portanto, as estratégias para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e economicamente viáveis são objeto de intensa investigação. A vacina contra a tuberculose (*M. bovis* sub cepa BCG Moreau), única disponível para uso clínico foi usado para liberar o gene que codifica para a toxina diftérica denominado de fragmento B (DTB). Neste estudo, a sequência de DNA que codifica o *dtb* foi clonada no vetor micobacteriano bifuncional (pUS977) de expressão citoplasmática. Os possíveis clones transformantes foram testados, o resultado da expressão do DTB  $pUS977dtb_{PW8}$  foi positivo, apresentou padrão de banda de



migração correspondente ao DTBr pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub>. Os lotes experimentais do BCG modificado e não modificado foram produzidos, camundongos BALB/c foram imunizados com  $1 \times 10^6$  CFU/mL do DTBr pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub>. Os resultados mostraram a soroconversão de anticorpos específicos confirmando que o antígeno foi expresso e apresentado ao sistema imunológico. O BCGr pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub> persistiu até 60 dias na ausência de pressão seletiva e a viabilidade celular não foi alterada significativamente durante o período testado.

As actividades funcionais dos soros imunes do BCG não modificado, rBCGpUS977 *dtb*<sub>PW8</sub> e DTP foram testados para a capacidade soro neutralizantes da toxina difterica em Células Vero, as diluições testadas variaram de 1/2 até 1/2048. A capacidade soroneutralizante em células Vero do BCGr pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub> foi baixa e precisa de ser repetida.

Palavras-chave: Vacina antidiftérica (DTP); vacina BCG (BCG Moreau); fragmento B da toxina diftérica (DTB); BCG recombinante (BCGr).

***Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the *dtb* gene antigen from diphtheria toxin**

Authors: Dilzamar V. Nascimento<sup>a</sup>, Odir A. Dellagostin<sup>b</sup>, Denise C. S. Matos<sup>c</sup>, McIntosh D<sup>e</sup>, Raphael Hirata Jr.<sup>a</sup>, Geraldo M. B. Pereira<sup>a,d</sup>, Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>a</sup>, Geraldo R.G. Armôa<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87, fundos, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21040-900

<sup>d</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>e</sup> Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7.23851-000, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Keywords: Recombinant BCG, diphtheria toxin *dtb* gene, Park Williams 8 (PW8) *Corynebacterium diphtheriae*, rDTB<sub>PW8</sub>, pUS977 vector.

\*Corresponding author: Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC. Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, RJ, Brazil. CEP 20 551-030.

Phone: +55 21 2868-8280; Fax: +55 21 2868-8376; E-mail: guaraldi@uerj.br; guaraldi@pq.cnpq.br.

## ABSTRACT

Diphtheria is a bacterial disease of fulminant evolution caused by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains, whose local and systemic manifestations are basically due to the action of the diphtheria toxin (DT). The diphtheria vaccine used worldwide is a toxoid obtained by detoxifying DT, is administered in combination with tetanus toxoid and pertussis whole cell vaccine (DTP), and has been shown to be very effective in the control of diphtheria. Although associated with high efficacy in the prevention of disease, the diphtheria vaccine may present some post vaccination effects such as toxicity and reactogenicity resulting from the presence of contaminants in the vaccine originated during the process of production and/or detoxification. Therefore, strategies to develop a less toxic and at the same time economically viable vaccine alternative are the subject of intense investigation worldwide. In this study, the Moreau substrain of BCG used in Brazil as a live vaccine against human tuberculosis was genetically modified to carry and express the gene encoding the diphtheria toxin fragment B (DTB). As such, the DNA sequence encoding the *dtb* gene was cloned into the bifunctional pUS977 vector for cytoplasmic expression and successfully introduced into BCG cells by electroporation. Experimental batches of modified and unmodified BCG were produced and a comparative immunization study was done in mice. The results showed seroconversion with the detection of specific antibodies against DTB and confirmed that the antigen expressed by rBCG pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> construct was properly submitted to the mice immune system. Furthermore, we verified that the rBCG pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> persisted up to 60 days in the absence of selective pressure in the mice and cell viability did not change significantly during the period tested. To test for the functional activities of these the immune sera of BALB/c mice vaccinated with unmodified BCG, rBCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> and DTP were tested for neutralizing capacity of the diphtheria toxin in Vero Cells, dilutions tested ranged from 1 / 2 to 1 / 2048. The soroneutralizante ability in Vero cells of BCGr pUS977*dtb*<sub>PW8</sub> was low and needs to be repeated.

## INTRODUCTION

*C. diphtheriae*, one of 59 described species in the *Corynebacterium* genus, causes the highly contagious infection diphtheria (Mattos-Guaraldi et al., 2001; Hirata et al., 2008; Kimura et al., 2011). *C. diphtheriae* produces DT and a pseudomembrane adherent to the tonsils, pharynx, and/or nose. The local and systemic manifestations of diphtheria are mainly related to the action of DT, which is the most studied virulence factor of this species (Pappenheimer, 1993; Wang et al., 2009; Man et al., 2010; Ladokhin, 2013). DT is a polypeptide of 535 amino acids with a molecular weight of approximately 58.3 kDa, which is proteolytically cleaved after secretion in two fragments with distinct activities. The aminoterminal fragment A (DTA) is responsible for toxicity and the nontoxic carboxyl fragment (DTB) with 341 amino acids is responsible for adherence and internalization of the DT (Lee et al, 2005; Chellapandi et al., 2013).

*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) used as a vaccine for the control of tuberculosis, is currently the most widely used vaccine in the world and has been given to more than three billion people since 1921 (Bloom and Fine, 1994; Benévolo-de-Andrade et al., 2005). For this reason BCG is among the best live vector candidates for the delivery of protective antigens in vivo, especially in developing countries where the cost of vaccines is a major issue. BCG is able to elicit potent Th1-mediated immune responses and require no additional adjuvant components in their formulation to evoke protective immunity, as demonstrated in several animal models of infectious diseases (Winter et al, 1994; Chapman et al., 2012; Grode et al., 2013). Additionally, several other advantages have been associated with the potential use of rBCG as an antigen-presenting system (Ohara and Yamada, 2001; Matsuo and Yasutomi, 2011). In this context, recombinant

BCG (rBCG) vaccines expressing a variety of parasite, bacterial or viral antigens have been shown to induce protective immune responses in murine and primate challenge models (Yasutomi et al., 1993; Langerman et al., 1994a; Langerman et al., 1994b; Winter et al., 1994; Kaufmann SHE, 2010; Grode et al., 2013).

We here report the construction of a rBCG based on the Brazilian Moreau vaccine substrain of *M. bovis* BCG expressing the *C. diphtheriae* gene *dtb*<sub>PW8</sub> using the non-integrative plasmid vector pUS977. Analysis of expression, structural stability and ability to induce a neutralizing humoral response against the diphtheria toxoid were carried out to verify the rBCG<sub>*dtb*<sub>PW8</sub></sub> potential as an *in vivo* delivery system for the a *corynebacterium* antigen.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Bacterial strains, plasmid and culture conditions***

The *C. diphtheriae* strain Park Williams 8 (ATCC 13812) was obtained from the Institute Butantan (São Paulo, Brazil) as a source of genomic DNA. *C. diphtheriae* was grown in BHI Brain Heart Infusion liquid (Difco, Detroit, EUA). *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ , grown on solid or liquid Luria-Bertani medium, was used for amplification of plasmids throughout the study. The Moreau substrain of *M. bovis* BCG used in vaccine production was obtained from the Fundação Ataufo de Paiva (Rio de Janeiro, Brazil) and was typically grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco) supplemented with 10 % albumin-dextrose-catalase (ADC), 0.2% glycerol and 0.05% Tween 80, or Middlebrook 7H10 agar (Difco) supplemented with ADC. When necessary, kanamycin was added to the mycobacteria media at a concentration of 25  $\mu$ g/mL for selection of recombinant bacteria. The plasmid vector pUS977 used in this study for expression of the *dtb* gene was obtained from Dr. M.A. Medeiros (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

### ***Construction of the pUS977 expression vector pUS977dtb<sub>PW8</sub>***

The pUS977 was built over the structure of the mycobacteria E.coli shuttle vector pUS972 (da Cruz et al, 2002) by the addition of the *pAN* promoter of *M. paratuberculosis* to drive the intracellular expression of heterologous genes. In order to build the pUS977<sub>dtb<sub>PW8</sub></sub> expression vector, a DNA fragment representing the entire *dtb* gene subunit encoding sequence was amplified from *C. diphtheriae* genomic DNA using the primers *dtb* forward (Gibco, BRL number: A2633B07 5' CGT CTA GAA GGT AGC TCA TTG TC 3' and *dtb* A2633B08 reverse 5' GCT CTA GAC CCC ACT ACC TTT C 3', each containing a XbaI restriction site. The resulting 0.965 kb fragment was digested with XbaI and cloned in frame in

pUS977, cut with the same enzyme, to create the construct pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub>. This construct was amplified in *E. coli* DH5 $\alpha$  and used to transform BCG by electroporation using standard methods (Parish and Stoker, 1997). Transformants were later selected by their resistance to kanamycin.

### ***Western blotting and localization of heterologous proteins in rBCG.***

After transformation recombinant BCG were selected on 7H10 Middelbrook medium containing 25  $\mu$ g of kanamycin/mL. Several resistant colonies were tested for their plasmid content by the eletroduction method described by Baulard et al., 1992 and for expression of DTB by Western Blotting. To run a Western blotting analysis one or more kanamycin-resistant BCG transformants were grown individually in 5 mL 7H9 Middlebrook liquid cultures supplemented with kanamycin (25 g/mL). After growth at 37°C 2.0 mL cultures were harvested at mid-log phase by centrifugation, resuspended in lysis buffer (10 mM Tris pH 8.0; 1 mM EDTA; 2 mM PMSF (phenyl methyl sufonyl fluoride) with 50 mg of glass beads (0.1 mm diameter) and then mixed three times for one minute each one and resting on ice. Then, the mycobacterial lysate was centrifugated and the resulting supernatant and pellet were separated and resuspended in sample buffer 1:1 (100 mM Tris-HCL, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol). Before being loaded samples were boiled for 10 minutes. After separation, proteins in the SDS-PAGE gel were electrotransferred onto a 0.45  $\square$ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) which was incubated overnight in 3 % nonfat dry milk in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 (vol/vol) (Sigma, St Louis, Mo., EUA). On the following day the membrane was incubated with a 1:1000 dilution of polyclonal primary antibodies produced in house anti diphtheria toxoid (PBS-T). After washing out the

primary antibody, the membrane was incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) diluted in PBS-T as the secondary antibody. Antibody binding was detected with NBT and BCIP (nitroblue tetrazolium chloride and 5-bromo-4chloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt) (Sigma) as a substrate.

### ***Evaluation of vector structural stability rBCG constructs***

The recombinant strain of BCG was recovered from the spleens of mice to evaluate the structural stability. After three consecutive samplings BCGr recovered from the spleens of vaccinated mice, the plasmid constructs were extracted and purified by use of a Flexi-Prep kit (Pharmacia). They were then transferred to *E. coli* DH5 $\alpha$  by electroduction according to (Baulard et al., 1992). The recovered and purified plasmids were digested with restriction endonucleases (*Xba*I or *Kpn*I). The presence or absence of structural changes in the recombinant plasmids were evaluated by comparing them with the banding pattern generated by the plasmid preparations used to produce the original transformant, by electrophoresis in agarose gel 1%.

### ***Stability and persistence of rBCG in human monocytes (THP-1)***

Cultures of human monocytes (THP-1) ( $1 \times 10^5$ ) were produced in 24 well plates, using RPMI 1640 supplemented with 2 mM L – glutamine, 10 mM HEPES and 10% fetal calf serum (FCS) as grown medium. THP-1 monolayers were infected with equivalent levels of BCG or rBCG strains at a multiplicity of infection (MOI) of approximately 10 bacterial cells per macrophage. Bacteria necessary for infection was prepared by dilution of log phase cultures to the desired concentration based on direct enumeration by light microscopy. The actual number of viable BCG and rBCG strains used in each infection experiment was verified retrospectively by plating serial dilutions of the culture on Middlebrook



7H10 agar (Difco) with incubation for up to 4 weeks. Samples (4 wells per culture) were collected at 4h, 24h, 48h, 5, 8, 9 and 12 days post-infection exposure. After that macrophages were lysed with 0.1% Tween 80 in distilled water (25  $\mu$ L/well), serial diluted and plated onto plain 7H10 agar (BCG control) or on the same medium with kanamycin (rBCG). The levels of growth recovered at 4 h were used to calculate the relative infective capabilities of the rBCG in comparison to control BCG. The values obtained for colony forming units (CFU) recovered at other time points were used to calculate the degree of intracellular persistence of the rBCG. The functional stability of rBCG was assessed by comparing the CFU values obtained in media with and without kanamycin according to a previously reported protocol (Varaldo et al., 2004).

### ***Immunization procedures***

Immunization experiments with 4-6 week-old male BALB/c mice were conducted in compliance with The Ethical Principles in Animal Experimentation established by the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Fundação Oswaldo Cruz - Animal Use Ethical Committee CEUA (P0163-03). Briefly, to evaluate the immune response against the BCG and rBCG strains, groups of 5 mice were immunized intraperitoneally (i.p) with  $10^6$  CFU/0.1 mL in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 80 (vol/vol) (Sigma, St Louis, Mo) (PBS-T) at day 0 and boosted 9 weeks later. As control each animal in the control group received 50  $\mu$ L of the conventional DPT vaccine. All animals were bled at different time points after priming at the retro-orbital plexus and sera obtained from blood at each were pooled and later analyzed by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) was performed for detection and quantitation of anti-rDTB<sub>PW8</sub> mouse antibodies.

### ***Analysis of the humoral immune response***

Serum antibody responses were quantified by ELISA. Briefly, Maxisorp 96-well plates (Nunc International, Rochester, N.Y.) were coated with the diphtheria toxoid (100  $\mu$ L; 0.05 g/mL in 0.2 M carbonate buffer/0.2 M Bicarbonato pH 9,6; 4°C overnight), then washed five times with PBS-T, blocked with 4% nonfat dry milk in PBS, and finally incubated with serial dilutions of mouse sera in PBS. After 1 hour at 37°C plates were washed as described above and incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:4,000) (Southern Biotechnology Associates, Inc.) in PBS at 37°C for 1 an hour. After another round of washings, antibodies were visualized by adding TMB substrate (100  $\mu$ L; 10 mg/mL 3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidine in citrate phosphate buffer, containing 0.01% peroxide hydrogen. After adding the substrate plates were sealed and incubated in the dark at room temperature for 10 minutes after which the reaction was stopped by adding 50  $\mu$ L of a 20 % sulphuric acid solution, and the optical density (OD) of the yellow-orange colour developed was measured at 450-492 nm in a spectrophotometer (Biorad). Absorbance values were plotted against serum dilutions.

### ***Vero cell method potency test.***

Vero CCL-81 cells were originally obtained from ATCC. The in vitro Vero cell method chosen for the purposes of this study is based on the protocol described by WHO (15) and was used for titration of the diphtheria antitoxin. Briefly, sera in twofold dilutions in 96-well plates were incubated in the presence of 0.01 Lf/mL of DTx (Sigma), which is usually neutralized by 0.031 IU/mL of standard anti-DTx per mL in cell medium RPMI (Gibco), without bovine serum for

an hour at room temperature in the dark. Vero cells in suspension ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) were added to each well of plates containing medium 199 with Earl's salt's (Gibco) with 4.4% sodium bicarbonate, gentamicin at 4 mg/mL and 5% fetal bovine serum. Plates were incubated for 96 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator and 90% relative humidity and cells were later fixed with 10% formaldehyde for an hour and stained with 1% crystal violet for thirty minutes. After that plates were washed in water to eliminate the excess of stain. After plates dried completely, Vero cells were examined visually and at the microscope. The titre of neutralizing antibodies in the pooled sera was calculated by multiplying the inverse of its endpoint dilution with that of the standard antitoxin, expressed in IU/ml. Each pool of sera was analyzed in duplicate, and controls for DTx and standart anti-DTx were included in all experiments.

## RESULTS

### ***Expression rDTBpw8 in BCG strains***

Based on these results as shown in Fig. 1A, only the recombinant BCG containing pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub> produced an immunoreactive band, corresponding to an approximately 45-kDa protein. The size of the protein was as expected, and it was recognized by anti-toxoid diphtheric polyclonal antibody.

### ***Structural and functional analysis of recombinant BCG recovered from the spleen of BALB/c mice***

The Fig. 2A shows the results of electrophoretic separation of PCR product from different colonies selected and shows that recombinant BCG recovered from the spleens of mice vaccinated carry the gene *dtb*, even after thirty and sixty days since vaccination. The analysis of the structural stability of recombinant BCG constructs recovered from the spleens of mice as shown in Fig. 2B. The results of digestion of plasmids isolated from *E. coli* with the endonuclease *Xba*I or *Kpn*I. The structural stability of the recombinant plasmid introduced into BCG should reflect a functional stability with the expression of target protein stably for several generations. In this work we find that the same rBCG recovered from the spleen of BALB/c mice 60 days after vaccination, when subjected to six consecutive sub-cultures showed no difference in ability to express the DTB, thus demonstrating the persistence of functional stability of the rBCG transformed with pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub> building Fig. 2C. The size of the protein was as expected, and it was recognized by anti-toxoid diphtheric polyclonal antibody.

### ***Infection of monocyte cultures (THP-1) with rBCG.***

The infectivity, bacterial persistence, and plasmid stability of the BCG or rBCG strain were evaluated in human monocyte cultures. A total of two separate infection experiments were conducted, using human monocytes cultures (THP-1). Specifically, the number of intracellular bacteria was maintained gradually along time. The comparison of the growth level in media with and without kanamycin demonstrated that recombinant strains did slight reduction of 1 and 2 logs in the level of vector Fig. 3.

### ***Immune response induced by rBCG***

In order to determine if recombinant BCG could induce a humoral immune response against fragment B, groups of five male BALB/c mice were immunized intraperitoneally with  $10^6$  CFU of BCG, BCGpUS977, rBCG pUS977 *dtb*<sub>PW8</sub> and DTP, and given boosters under the same conditions after 9 weeks. Sera were collected 4 weeks after immunization, pooled, and tested by ELISA for the induction of antibodies against fragment B as shown in Fig. 4. Mice immunized with rBCG showed a twofold increase in anti-fragment B antibodies in relation to BCG control at 2 months from the initial vaccination. The BCGr induce an immune response (IgG). The peak of the immune response was 12 weeks (2500). However at 20 weeks of the title keep it self immune response is above 2000.

### ***Analysis of neutralizing capacity of sera from mice vaccinated***

To test for the functional activities of these the immune sera of BALB/c mice vaccinated with unmodified BCG, rBCGpUS977 *dtb*<sub>PW8</sub> and DTP were tested for neutralizing capacity of the diphtheria toxin in Vero Cells, dilutions tested ranged from 1 / 2 to 1 / 2048. The results were reproducible and all sera were evaluated, but only those obtained with sixty days after vaccination were able to neutralize

the cytotoxic action of the toxin dilutions between 1 / 4 and 1 / 16. At this point, the pooled sera from 60 days (animals vaccinated with rBCGpUS977 *dtb*<sub>PW8</sub>) were shown to have 1.984 IU / mL and 0.992 IU / mL for DTP vaccine (60 days) of active anti-diphtheria toxin neutralization assay by the Vero Cell (Gupta et al., 1994). The reading was done visually by observing the holes with approximately 50% of color. Serum titres were given by the inverse of serum dilution (whole 50% of cells stained) multiplied by the titre of the reference serum (Miyamura et al., 1974; Miyaji et al., 2001).

## DISCUSSION

Since the first transformation of mycobacteria with foreign DNA (Jacobs et al., 1987) the now called recombinant BCG technology has evolved enormously and numerous are the studies in the last 26 years dealing with the expression of foreign protective antigens in BCG, either for the development of BCG as a stable multivalent live vaccine vector (Medeiros et al., 2002; Varaldo et al., 2006; Bastos et al., 2009; Matsuo and Yasutomi, 2011) or for the development of new and improved vaccines based on this technology (Varaldo et al., 2004; Medeiros et al., 2005; Rezende et al., 2005; Michelon et al., 2006; Santangelo et al., 2007; Nascimento et al., 2008; Chapman et al., 2012; Grode et al., 2013). Despite the advances reached so far a major limitation of the rBCG technology is the stability of the modified BCG (Nascimento et al., 2013). In this paper we show a preliminary evaluation of a new rBCG strain (pUS977 *dtbpw8*) expressing the non-toxic fragment B (DTB) of the diphtheria toxin in vitro e in vivo.

The expression of *C. diphtheriae* antigens in bacteria has been done before (Barbieri and Collier, 1987; Bishal et al., 1987; Cabiaux et al., 1988; Orr et al., 1999; Miyaji et al., 2001; Lee et al., 2004; Lee et al., 2005). In BCG, however, the only antigens of *C. diphtheriae* expressed so far were the CRM 197 (Miyaji et al., 2001) and the DTB (Nascimento et al., 2013). The cross-reacting material CRM 197 is a mutant of the diphtheria toxin and DTB is the safer nontoxic subunit B of the diphtheria toxin. The DTB is crucial for adhesion of the toxin to target cell receptors, a fundamental step in the internalization of the toxic subunit A (DTA). Thus, it is expected that antibodies generated against the DTB will interfere with the toxin adhesion and internalization process and will, consequently, neutralize the action of toxigenic *C. diphtheriae* strains.

The DTB was expressed for the first time in bacteria in *E. coli* (Cabiaux et al., 1988). Later it was expressed as a fusion polypeptide to the SpaP in *Streptococcus mutans* (Lee et al., 2005) but not in the live oral vaccine candidate *Streptococcus gordonii* (Lee et al., 2005). In our hands it was initially expressed in *E. coli* (Nascimento et al., 2010) and more recently in the Moreau BCG, the strain used to produce the vaccine tuberculosis in Brazil (Nascimento et al., 2013). The latter was a first demonstration that the safer fragment B of the diphtheria toxin can be stably expressed in BCG. While the mutant CRM 197 (pBlaf\*CRM 197) was expressed in BCG using the promoter pBlaf (Miyaji et al., 2001) in our work we used  $P_{AN}$ , a weaker promoter derived from IS900 of *M. paratuberculosis* (Murray et al., 1992), to drive the expression of DTB in the cytoplasm of BCG cells. Our results clearly show that the 40 kDa DTB polypeptide is well expressed and tolerated by rBCGpUS977dtbpw8 and is also recognized by anti-DT toxoid antibodies in immunoblottings of rBCG lysates. We also observed that the rBCGpUS977dtbpw8 remained genetically stable and fully functional even after recovery from the spleens of BALB/c mice immunized with the same rBCGs expressing DTB, as demonstrated by the immunoblotting of recombinant mycobacteria lysates obtained after six consecutive passages in liquid media, with anti-DT specific sera. Also important to mention is the observation that the pUS977dtbpw8 construct used to transform the Moreau BCG remained unchanged after been recovered from rBCGpUS977dtbpw8 or *E. coli* kept frozen in our laboratory. All considered, our in vitro and in vivo studies demonstrate that the rBCGpUS977dtbpw8 is a very stable and promising construction for further studies.



We evaluated the ability of the rBCGpUS977 *dtb*pw8 to infect and persist in human monocytes cells (THP-1) and also its capacity of inducing a specific anti-DT immune response in BALB/c mice. The competence of the live modified bacterial vector to enter into the monocyte and persist there for a given time is a fundamental part of the antigen presentation process and the rBCGpUS977 *dtb*pw8 was able to prove it. The infectivity/persistence study was carried out in THP-1 human monocytes in two independent experiments (8 and 12 days, respectively), in the presence or absence of kanamycin as the selective pressure agent (Varaldo et al., 2004). Our results showed that the rBCGpUS977 *dtb*pw8 retained full infectivity when compared to non-modified BCG and was able to persist in THP-1 cells up to the maximum time limit tested in our laboratory (12 days) without plasmid loss in the absence of kanamycin. Also, viability counts of both rBCGpUS977 *dtb*pw8 and non modified BCG originated from infected THP-1 cells were similar in all time points in both experiments, independently of the presence of kanamycin, which denotes the stability of the rBCGpUS977 *dtb*pw8 inside a human cell even in the absence of selective pressure. Our data confirm the stability results obtained by others with the extrachromosomal plasmid vector pUS977 (Medeiros et al., 2005; Rezende et al., 2005; Seixas et al., 2007). Additionally, the genetic integrity of plasmids was confirmed later by PCR analyses of plasmids electroeluted to *E.coli* from rBCGs recovered from THP-1 cells.

The induction of a detectable immune response to heterologous antigens expressed by live vaccine vectors such as the BCG is directly correlated to the stability of the expression system chosen (Dennehy and Williamson, 2005). We reported above that the rBCGpUS977 *dtb*pw8 was impressively stable when

subjected to the THP-1 cell intracellular environment and that it retained both structural and functional integrities afterwards. In our study we also verified that BALB/c mice vaccinated with the rBCGpUS977 *dtb*pw8 and boosted 9 weeks later with the same construction and dose, were able to mount a specific immune response against the diphtheria toxoid. Sera collected from immunized mice and controls up to 20 weeks revealed that the immune response anti-DT peaked 3 weeks after the booster with high titer antibodies and was two-fold superior when compared to the response induced by the classic cellular DTP vaccine. At the 20 weeks time point the response to the rBCGpUS977 *dtb*pw8 was still almost as high as for the 12 weeks interval and DTP low compared to. In a study using the same expression vector pUS977 and promoter by Medeiros et al demonstrated the long term humoral response (up to 8 months) induced by mice vaccinated with a rBCG strain expressing the S1 subunit of pertussis toxin (Medeiros et al., 2005).

More important than the induction of a specific anti-DT response is the demonstration that antibodies from mice vaccinated with the new rBCG strain are able to neutralize DT. As a preliminary approach on that direction a Vero Cell assay (World Health Organization, 1993) was standardized and validated in our laboratory to estimate the neutralizing potency of a 60 days serum from mice immunized with the rBCGpUS977 *dtb*pw8. While the rBCG expressing CRM 197 was unable to generate a neutralizing response (Miyaji et al., 2001) our first results showed that under the giving conditions neutralization of DT is possible at low sera dilutions (1:4 and 1:16) and this is very exciting to start with since our new strain rBCGpUS977 *dtb*pw8 has proved to function very well in all steps so far. However, our neutralization study needs to be redone with sera from the point where the response peaks up and from other time points closer to it to evaluate the complete

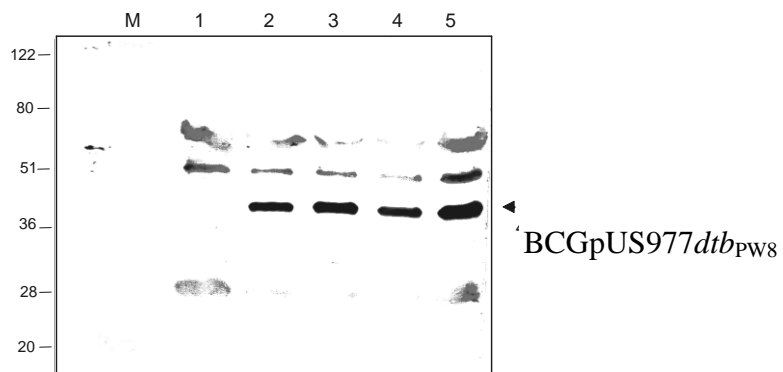
range and neutralizing quality of the antibodies generated. It is also important to keep in mind that sera neutralizing capabilities in mice, guinea pigs and humans are not comparable and further studies will need to be done next.

According to our own experience not all heterologous antigens are well tolerated and expressed by BCG. Therefore, the expression of each antigen needs a specific harmonization to work properly. In our case, the successful expression and stability of DTB, both in vitro and in vivo, and the induction of a specific neutralizing antibody response resulted from the perfect combination of the Moreau substrain of BCG, as the live vector, the extrachromosomal expression system based on the pUS977 construct driven by the  $P_{AN}$  promoter from *M. paratuberculosis*, and the DTB 0.965 kb DNA coding sequence. Taken together, the results accomplished until today with the diphtheria rBCG project strongly suggest that our new strain rBCGpUS977*dtb*pw8 holds a great potential for more investment and studies towards the development of a live alternative vectored vaccine against diphtheria.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Research supported by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, PAPES II/FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq, CAPES, Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX/MCT/CNPq). We thank Fundação Athaúfo de Paiva (Rio de Janeiro, Brasil) the strain of BCG.

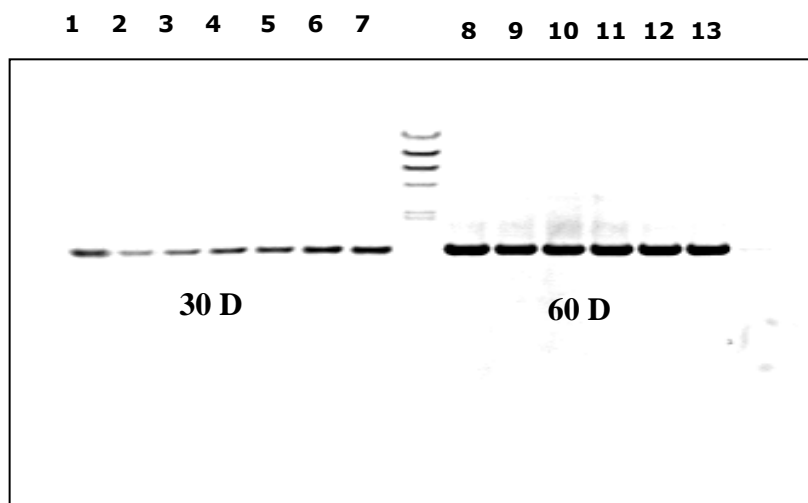
Declaration of interest none.

**FIGURE 1**

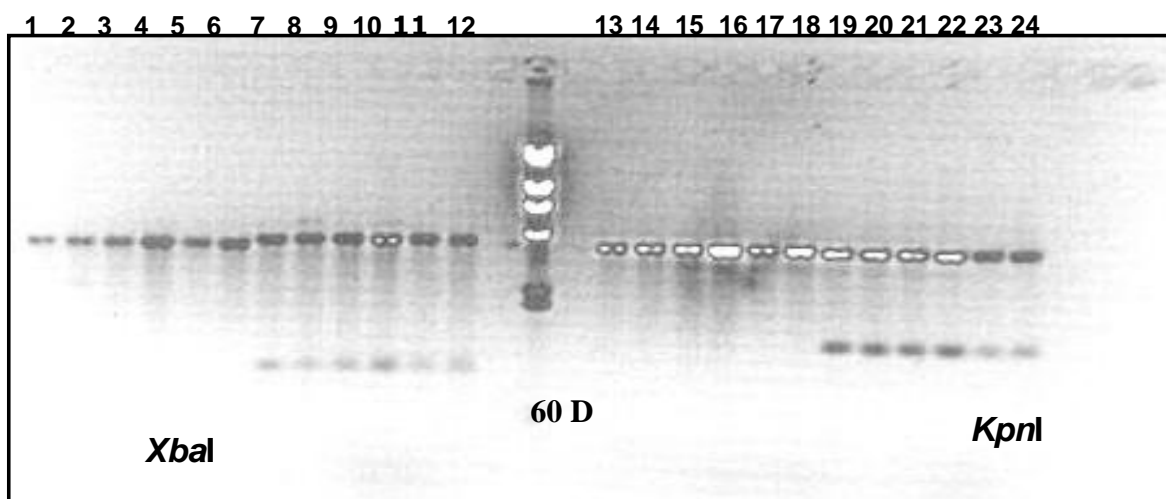
**Fig.1.** Expression of fragment B by BCGpUS977dtb<sub>PW8</sub>. Cell extracts of BCGpUS977dtb<sub>PW8</sub> or BCG were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting analysis with anti-diphtheria toxoid polyclonal antibodies. Lane 1: cell extract of non-modified BCG (negative control); lanes 2 through 5: cell extracts of rBCG and lane M: molecular weight markers (Broad Range) 122, 80, 51, 36, 28 and 20 kDa).

FIGURE 2

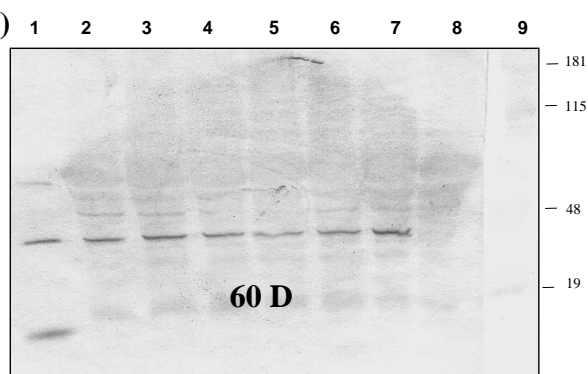
(A)



(B)



(C)

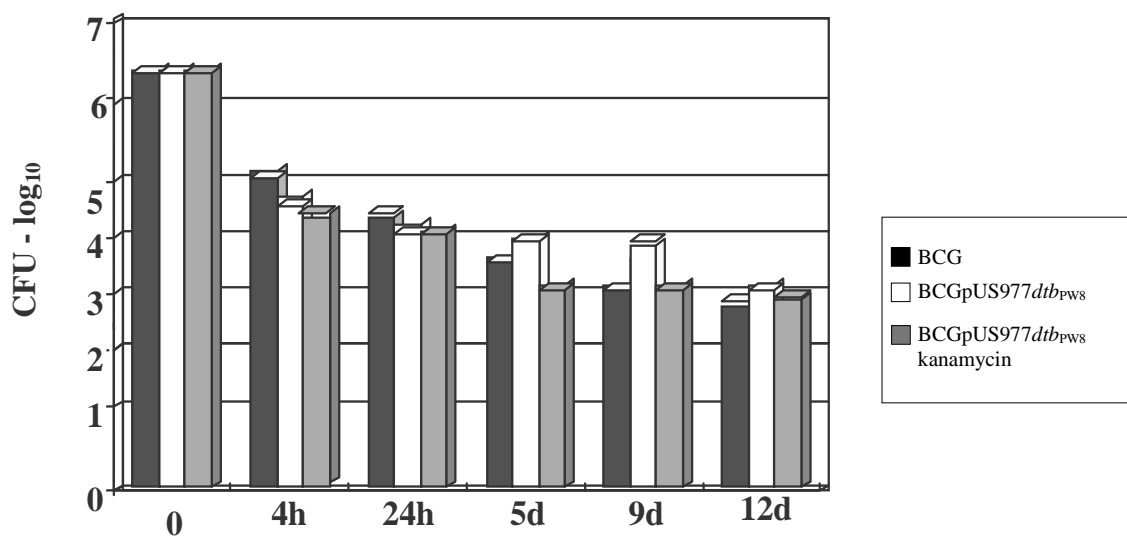


**Fig.2A.** Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> colonies isolated from spleens of Balb/c mice 30 and 60 days after vaccination. Lane 1: pUS977*dtb* plasmid construct (positive control); lanes 2, 3 and 4: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (30 days colonies 5.1, 5.2 and 5.3); lanes 5, 6 and 7: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (30 days colonies 7.1, 7.2 and 7.3); central lane: standard DNA markers ( $\lambda$  *HindIII*); lanes 8, 9 and 10: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (60 days colonies 5.1, 5.2 and 5.3); lanes 11, 12 and 13: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (60 days colonies 7.1, 7.2 and 7.3).

**Fig.2B.** Agarose gel electrophoresis of plasmid constructs isolated from colonies of BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> recovered from spleens of Balb/c mice 60 days after vaccination linearized with *XbaI* (lanes 1 -12) and *KpnI* (lanes 13-24). Lane 1 and 13: pUS977 (positive control); lanes 2 and 3: BCGpUS977 (colonies 1.1 and 1.2); lanes 4, 5 and 6: BCG pUS977 (colonies 3.1, 3.2 and 3.3); lanes 7, 8 and 9: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (colonies 5.1, 5.2 and 5.3); lanes 10, 11 and 12: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (colonies 7.1, 7.2 and 7.3); central rail: standard DNA markers ( $\lambda$  *HindIII*); lanes 14 and 15: BCGpUS977 (colonies 1.1 and 1.2); lanes 16, 17 and 18: BCGpUS977 (colonies 3.1, 3.2 and 3.3); lanes 19, 20 and 21: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (colonies 5.1, 5.2 and 5.3); lanes 22, 23 and 24: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (colonies 7.1, 7.2 and 7.3).

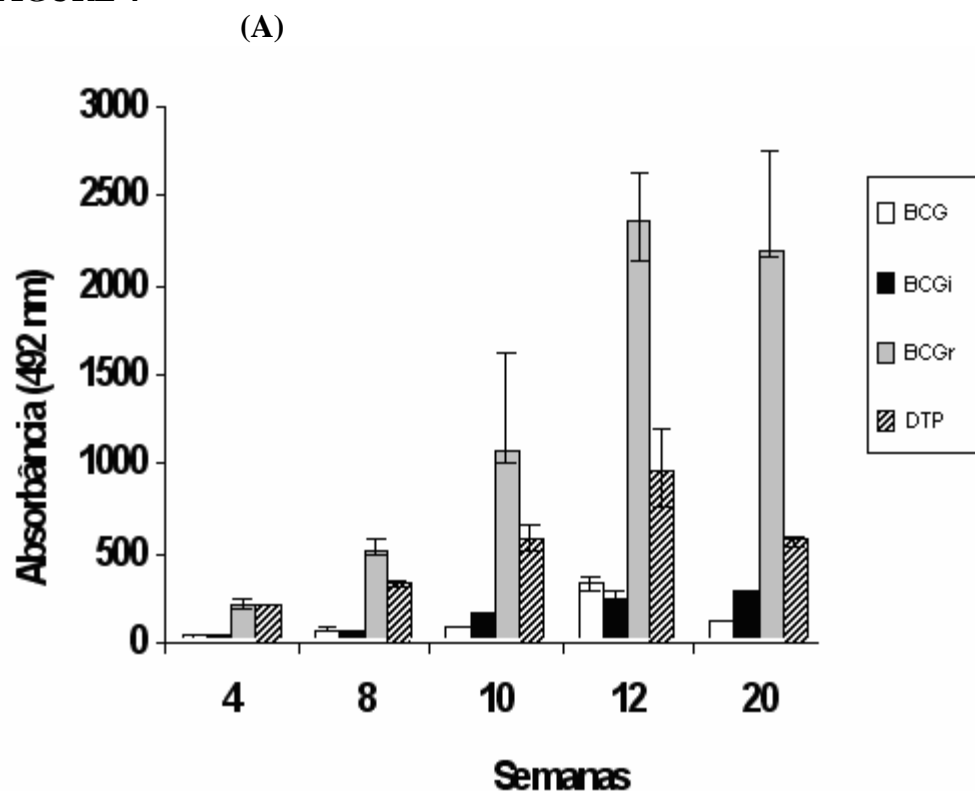
**Fig.2C.** Functional analysis of BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> recovered from the spleen of Balb /c mice 60 days after vaccination by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-diphtheria toxoid polyclonal antibodies. Lane 1: 1.18 mg/mL diphtheria toxin; lane 2: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> first passage in Middlebrook 7H9; lanes 3, 4, 5, 6 and 7: BCGpUS977*dtb*<sub>PW8</sub> (second to sixth passages in Middlebrook 7H9; lane 8: non modified BCG; lane 9: molecular weight markers.

FIGURE 3



**Fig.3.** Evaluation of infectivity, persistence, and plasmid maintenance of BCGpUS977dtb<sub>PW8</sub>, and BCG, in human monocytes (THP-1). The graphic displays the kinetics of persistence of BCGpUS977dtb<sub>PW8</sub> and BCG up to 12 days. CFU are shown in log<sub>10</sub> units. Values recorded at 4 h represent the numbers of bacteria which had been internalized after 4 h of contact with cells. Values recorded at 24 h, 48 h and 5, 8, 9, 12 days indicate the intracellular persistence of each BCG strain.

FIGURE 4



**Fig.4.** Specific antibody response induced by BCGpUS977dtb<sub>PW8</sub> in Balb/c mice. Groups of 5 male mice (4 to 6 weeks old) were immunized with  $10^6$  CFU mL of BCG BCGpUS977dtb<sub>PW8</sub> or DTP vaccine (positive control). The graphic displays the presence of antibodies against the diphtheria toxoid in pooled sera collected at different time points as quantified by ELISA (A 492nm).



## REFERENCES

1. Abomoelak, B., Huygen, K., Kremer, L., Turneer, M., Locht, C., 1999. Humoral and Cellular immune responses in mice immunized with recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus calmette guérin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein. *Infect. Immun.* 67, 5100-5105.
2. Aldovani, A., Young, R.A., 1991. Humoral and cell-mediated immune response to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 351, 479-482.
3. Arkoosh, M.R., Kaattari, S.L., 1990. Quantitation of fish antibody to a specific antigen by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Techn. in fish immun.* 15-24.
4. Barbieri, J.T., Collier, R.J., 1987. Expression of a mutant, full-length form of diphtheria toxin in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55 (7), 1647-1651.
5. Bastos, R.G., Borsuk, S., Seixas, F.K., Dellagostin, O.A., 2009. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 27, 6495-6503.
6. Baulard, A., Jourdan, C., Mercenier, A., Locht, C., 1992. Rapid mycobacterial plasmid analysis by electrofusion between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 20 (15), 4105.
7. Benévolo-de-Andrade, T.C., Monteiro-Maia, R., Cosgrove, C., Castello-Branco, L.R., 2005. BCG Moreau Rio de Janeiro An oral vaccine against tuberculosis Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 459-465.
8. Bishai, W.R., Miyanochara, A., Murphy, J.R., 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of three fragments of diphtheria toxin truncated within fragment B. *J. Bacteriol.* 169(4), 1554-1563.
9. Bloom, B.R., Fine, P.E.M., 1994. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis:*

- Pathogenesis, Protection, and Control. Washington, DC: ASM Press; p. 531–58.
10. Cabiliaux, V., Phalipon, A., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruyschaert, J.M., Kaczorek, M., 1988. Expression of a biologically active diphtheria toxin fragment B in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2(3), 339-346.
  11. Chapman, R., Shephard, E., Stutz, H., Douglass, N., Sambandamurthy, V., Garcia, I., Ryffel, B., Jacobs, W., Williamson, A.L., 2012. Priming with a recombinant pantothenate auxotroph of *Mycobacterium bovis* BCG and boosting with MVA elicits HIV-1 Gag specific CD8+ T cells. *PLoS One* 7(3), e32769.
  12. Chellapandi, P., Sakthishree, S., Bharathi, M., 2013. Phylogenetic approach for inferring the origin and functional evolution of bacterial ADP-ribosylation superfamily. *Protein Pept. Lett.* 20, 1054-1065.
  13. Colditz, G.A.T., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Durdick, E., Fineberg, H.V., Mosteller, F., 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *JAMA* 271, 698-702.
  14. Connell, N.D., Acosta, E.M., McMaster, W., Bloom, B.R., Russell, D.G., 1993. Effective expressing immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacilli Calmette Guérin Leishmania surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11473-11477.
  15. Corbel MJ, Mastrantonio P, Kreeftenberg JG. Adhoc working group on acellular pertussis Vaccines, World Health Organization, Geneva, 27-28, 2000. 2002; 20: 288-91.

16. Dennehy, M., Williamson, A.L., 2005. Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 23, 1209-1224.
17. De Zoysa, A., Hawkey, P.M., Engler, K., George, R., Mann, G., Reilly, W., 2005. Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4377–4381.
18. Fine, P., Carneiro, I., Milstein, J., Clements, C., 1999. Issues relating to the use of BCG in Immunization programmers. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
19. Grode, L., Ganoza, C. A., Brohm, C., Weiner, J., Eisele, B., Kaufmann, S.H.E. 2013. Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine* 31, 1340– 1348.
20. Gupta, R.K., Higham, S., Gupta, C.K., Rost, B., Siber, G.R., 1994. Suitability of the Vero Cell method for titration of diphtheria antitoxin in the United States potency test for diphtheria toxoid. *Biologicals* 22, 65-72.
21. Higham, S., Gupta, C.K., Rost, B., Siber, G.R., 1994. Suitability of Vero cell method for titration of diphtheria antitoxin in the United States potency test for diphtheria toxoid. *Biologicals* 22, 65-72.
22. Hirata, R., Jr., Pereira, G. A., Filardy, A. A., Gomes, D. L. R., Damasco, P. V., Rosa, A. C. P., Nagao, P. E., Pimenta, F. P., Mattos-Guaraldi, A. L., 2008. Potential pathogenic role of aggregative adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41, 986–991.

23. Honda, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Yoshizaki, H., Kitamura, K., Sugiura, K., Watanabe, K., Fukushima, Y., Haga, S., Katsura, Y., Tasaka, K., Komuro, K., Yamada, T., Asano, T., Yamazaki, A., Yamazaki, S., 1995. Protective immune responses induced by secretion of a chimeric soluble Protein from a recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin vector candidate vaccine for human Immunodeficiency virus type 1 in small animals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 10693-10697.
24. Jacobs, W. R. Jr., Tuckman, M., Bloom, B.R., 1987. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid. Nature 327, 532-535.
25. Kaufmann, S.H.E., 2006. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. Nature Rev. 6, 699-704.
26. Kaufmann, S.H.E., 2010. Foresight: Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. Journal of Internal Medicine 267, 337–353.
27. Kimura, Y., Watanabe, Y., Suga, N., Suzuki, N., Maeda, K., Suzuki, K., Kitagawa, W., Miura, N., Morita, H., Imai, H., 2011. Acute peritonitis due to Corynebacterium ulcerans in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis: a case report and literature review. Clin. Exp. Nephrol. 15, 171–174.
28. Kremer, L., Riveau, G., Baulard, A., Capron, A., Loch, C., 1996. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. J. Immunol. 156, 4309 - 4317.

29. Ladokhin, A.S., 2013. pH-triggered conformational switching along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain. *Toxins (Basel)* 5, 1362-1380.
30. Lagranderie, M., Man, R. Lo., Deriaud, E., Gicquel, B., Gheorghiu, M., Leclerc, C., 1997. Genetic control of antibody responses induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a foreign antigen. *Infect. Immun.* 65, 3057-3064.
31. Langermann, S., Palaszynski, S.R., Burlein, J.E., Koenig, S., Hanson, M.S., Briles, D.E., Stover, C.K., 1994a. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacilli Calmette-Guérin vaccines expressing pneumococcal surface protein. *A. J. Exp. Med.* 180, 2277-2286.
32. Langermann, S., Palaszynski, S.R., Sadziene, A., Stover, C.K., Koenig, S., 1994b. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing an outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 372, 552-555.
33. Lee, C.W., Lee, S.F., Halperin, S.A., 2004. Expression and immunogenicity of a recombinant diphtheria toxin fragment A in *Streptococcus gordonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8), 4569-74.
34. Lee, C.W., Halperin, S.A., Morris, A., Lee, S.F., 2005. Expression of diphtheria toxin in *Streptococcus mutans* and induction of toxin neutralizing antisera. *Can. J. Microbiol.* 51, 841-846.
35. Man, P., Montagner, C., Vitrac, H., Kavan, D., Pichard, S., Gillet, D., Forest, E., Forge, V., 2010. Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen-deuterium exchange measurements. *FEBS J.* 277, 653-662.

36. Manual of laboratory methods for the testing for potency of Diphtheria (D), Tetanus (T), Pertussis (P) and combined vaccines used in the WHO 1993. Introduction to potency control of bacterial vaccines. WHO/BLG/92.1.
37. Matsuo, K., Yasutomi, Y., 2011. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. *Tuberc. Res. Treat.* Art. ID 574591, 9 pages.
38. Mattos-Guaraldi, A. L., Formiga, L. C. D., Camello, T. C. F., Pereira, G. A., Hirata, R. Jr., Halpern, M., 2001. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev. Argent. Microbiol.* 33, 96–100.
39. Mazzantini, R.P., Miyaji, E.N., Dias, W.O., Sakauchi, D, Nascimento, A.L.T.O., Raw, I., Winter, N., Gicquel, B., Rappuoli, R., Leite, L.C.C., 2004. Adjuvant activity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197 on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 22, 740-746.
40. Medeiros, M.A., Delagostin, O.A., Armôa, G.R., Degrave, W.M., De Mendonça-Lima, L., Lopes, M.Q., Costa, J.F., Mcfadden, J., McIntosh, D., 2002. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. *Microbiol.* 148, 1999-2009.
41. Medeiros, M.A., Armôa, G.R.G., McIntosh, D., Delagostin, A.O., 2005, Differential humoral immune response induced in mice immunized with two strains of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of Bordetella pertussis toxin. *Can. J. Microbiol.* 51, 1-6.
42. Miyaji, E. N., Mazzantini, R. P., Waldely, O.D., Nascimento, A.L.T.O., Gupta, R.K., 2001. Induction of neutralizing antibodies against diphtheria

- toxin by priming with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197, a mutant diphtheria toxin. *Infect. Immun.* 69, 869-874.
43. Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., Murata, R., Kono, R., 1974. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres used VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J. Biol. Stan.* 2, 189-201.
44. Murray, A., Winter, N., Lagranderie, M., Hill, D.F., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Moriarty, K.M., Gheorghiu, M., Gicquel, B., 1992. Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol. Microbiol.* 6, 3331-3342.
45. Nascimento, I.P., Dias, W.O., Quintilio, W., Christ, A.P., Moraes, J.F., Vancetto, M.D., 2008. Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against *Bordetella pertussis* intracerebral challenge. *Microb. Infect.* 10, 198-202.
46. Nascimento, D.V., Lemes, E.M.B., Silza, Jr. J.G., Nascimento, H. J., Silva, E.D., Hirata, R. Jr., Dias, A.A.S.O., Santos, C.S., Pereira, G.M.B., Mattos-Guaraldi, A.L., Armôa, G.R.G., 2010. Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the park williams 8 *Corynebacterium diphtheriae* strain toxin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 460-466.
47. Nascimento, D.V., Dellagostin, A.O., Hirata, R. Jr., Pereira, G.M.B., Mattos-Guaraldi, A.L., Armôa, G.R.G., 2013. Plasmid instability when the hsp60 gene promoter is used to express the protective non-toxic fragment B of the diphtheria toxin in recombinant BCG. *Amer. J. Mol. Biol.* 3, 81-86.

48. Ohara, N., Yamada, T., 2001. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 19, 4089–4098.
49. Orr, N., Galen, J.E., Levine, M.M., 1999. Expression and Immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM197, and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908- htr A. *Infect. Immun.* 67 (8), 4290-4294.
50. Pappenheimer, A.M. Jr., 1993. The story of a toxic protein, 1888-1992. *Protein Sci.* 2, 292-298.
51. Pimenta, F.P., Damasco, P.V., Neto, J.C., Lopes, G.S., Hirata, Jr. R., Milagres, L.G., Matos-Guaraldi, A.L., 2006. Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 459-462.
52. Rezende, C.A.F., De Moraes, M.T.B., Matos, D.C.S., McIntosh, D., Armôa, G.R.G., 2005. Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens. *J. Virol. Methods* 125, 1-9.
53. Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
54. Santangelo, M.P., McIntosh, D., Bigi, F., Armôa, G.R., Campos, A.S.D., Ruybal, P., Dellagostin, O.A., McFadden, J., Mendum, T., Gicquel, B., Winter, N., Farber, M., Cataldi, A., 2007. *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*. *Vaccine* 25, 1104-1113.
55. Seixas, F.K., da Silva, EF., Hartwig, D.D., Cerqueira, G.M., Amaral, M., Fagundes, M.Q., 2007. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG



- expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine* 26, 88-95.
56. Stover, C.K., De la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs, W.R., Bloom, B.R., 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351, 456- 460.
57. Varaldo, P.B., Leite, L.C.C., Dias, W.O., Miyaji, E.M., Torres, F.I.G., Gebara, V.C., Armôa, G.R.G., Campos, A.S., Matos, D.C.S., Winter, N., Gicquel, B., Vilar, M.M., McFadden, J., Almeida, M.S., Tendler, M., McIntosh, D., 2004. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 Antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infect. Immun.* 72, 3336-3343.
58. Varaldo, P.B., Miyaji, E.N., Vilar, M.M., Campos, A.S.D., Dias, W.O. Armôa, G.R., Tendler, M., Leite, L. C., McIntosh, D., 2006. Mycobacteria Codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistossoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances expression but not protection against cercarial challenge in mice. *FEMS Immun. Med. Microb.* 48, 132-139.
59. Wang, J., London, E., 2009. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. *Biochemistry* 48, 10446-10456.
60. Winter, N., Lagranderie, M., Gangloff, S., Leclerc, C., Gheorghiu, M., Gicquel, B., 1995. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251

nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* 13, 471–478.

61. World Health Organization (WHO), 1993. Laboratory methods for the testing for potency of diphtheria (D), tetanus (T), pertussis (P) and combined. 26 January. p. 1-105.

62. Yasutomi, Y., Koenig, S., Haun, S.S., Stover, C.K., Jackson, R.K., Conrad, P. 1993. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 150, 3101–3107.

## 4 DISCUSSÃO

A cada inspiração inalamos diversos microrganismos; assim o trato respiratório superior é porta de entrada principal para patógenos. De fato, as infecções do sistema respiratório são o tipo mais comum de infecção – e um dos mais nocivos. Dentre eles destaca-se a difteria, uma doença microbiana do sistema respiratório, causada por bacilo toxigênico que frequentemente se aloja nas amígdalas, faringe, laringe, nariz e, ocasionalmente, em outras mucosas e na pele. É caracterizada por placas pseudomembranosas típicas. A eficácia da vacina contra difteria permanece motivo de constante preocupação entre diversos investigadores (Mortimer & Wharton, 2004; Damasco *et al*, 2005; Kimura *et al*, 2011). A endemicidade das infecções pelo bacilo diftérico em nosso ambiente, assim como em diversos países em desenvolvimento, causando além da doença clássica, infecções sistêmicas ou atípicas (Pereira, 2001; Pimenta *et al*, 2006), estimulam as pesquisas relacionadas com a eficácia da vacina DTP. A tecnologia do DNA recombinante garante menos efeitos adversos ou toxicidade, teve início na década de 80 e tem se mostrado uma ferramenta útil no desenvolvimento de novas vacinas produzidas com antígenos purificados e de maior especificidade e estabilidade (Ministério da Saúde, 1980-2005; Scarselli *et al*, 2005; Byard, 2013).

O *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) é uma cepa atenuada do *M. bovis* que tem sido amplamente utilizada como uma vacina contra a tuberculose humana, e hoje ainda desempenha um papel importante na imunização contra essa doença, oficialmente recomendada há mais de 80 anos (Bloom and Fine, 1994; Benévolo-de-Andrade *et al*, 2005; Bastos *et al*, 2009). Esta vacina viva bacteriana é capaz de estabelecer uma infecção persistente e induzir resposta imune celular e humoral de longa duração (Winter *et al*, 1994; Chapman *et al*, 2012; Grode *et al*, 2013). O sistema genético de micobactérias para expressão de antígenos, somado ao poder adjuvante do BCG é a base do uso potencial desta micobactéria atenuada como vacina recombinante (Jacobs *et al*, 1987; Winter *et al*, 1994). Ao longo dos últimos 20 anos cepas da BCG modificada com propriedades imunoestimuladora melhorada foram geneticamente modificadas e testadas, principalmente como iniciativa para melhorar a eficácia da vacina contra tuberculose, assim como outras doenças (Chapman *et al*, 2012; Grode *et al*, 2013), tornando-se uma vacina realmente

polivalente. O uso do BCG recombinante como imunomodulador têm sido largamente utilizado para modular o sistema imunológico a um antígeno específico e tem de fato melhorado este efeito (Bonaldo *et al*, 2010).

No presente estudo, o interesse em investigar o potencial do fragmento B (DTB) um antígeno de relevância clínica associado com proteção de *C. diphtheriae* (cepa vacinal PW 8), o qual está presente como um componente da vacina pediátrica contra difteria, pertussis e tétano (DTP), como candidato vacinal foi devido a apresentação de sua atividade multifuncional, participando na aderência da toxina diftérica a superfície da célula eucariótica aliado a baixa toxicidade da molécula (Cabiaux, *et al* 1988). O DTB é a parte mais variável da molécula, entretanto, os anticorpos gerados contra o DTB conferem proteção, pois são capazes de neutralizar a atividade da toxina (Mortimer & Wharton, 2004; Gor *et al*, 2006).

Os dados obtidos na primeira etapa de experimentos deste estudo demonstraram que os ensaios de clonagem e expressão utilizando vetores comerciais (Modulo de Purificação QIA expressionist TM®) confirmou a habilidade do sistema em produzir eficientemente a proteína recombinante DTBr, imunologicamente idêntica ao da toxina oriunda da cepa vacinal PW 8, utilizada no preparo das vacinas DT e DTP. Nesta oportunidade, o gene *dtb* foi clonado no vetor pQE-30 e a proteína recombinante obtida apresentou 40 kDa de peso molecular correspondente ao da molécula íntegra, por apresentar fusão a seis aminoácidos na extremidade C-terminal (cauda de histidina), com a transcrição sob controle dos promotores da T5 RNA polimerase e *lacO* de *E. coli*. A utilização deste kit trouxe vantagens, uma vez que o DTB pode ser rapidamente purificado em coluna de afinidade NI-Superflow (Ni-NTA), amplamente utilizada em procedimentos de produção e purificação de proteínas recombinantes. Os dados obtidos com DTBr<sub>PW8</sub> vem ampliar o reconhecimento da eficácia do kit QIAexpressionist, já anteriormente reconhecido em outros estudos de produção e purificação de proteínas recombinantes diversas. Estudos anteriores permitiram a purificação de proteínas recombinantes pela técnica de fusionar o gene *OspA* (*Borrelia burgdorferi*) a cauda de histidina (Beláková *et al*, 2005). Em nosso estudo, apesar do alto nível de expressão em *E. coli* M15™ o rendimento da proteína DTBr<sub>PW8</sub> purificada foi de 0,38 mg/mL. A análise densitométrica das bandas separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE mostrou, como esperado, que o pico mais alto de 84,8% continha a proteína alvo DTBr<sub>PW8</sub>. Também demonstramos que a cromatografia de afinidade

Superdex-200 pode ser empregada para melhorar a resolução do trajeto da proteína em coluna de cromatografia. Tal progresso foi indicado através do aumento da intensidade do pico de peptídeo. Após as etapas de produção e purificação do DTBr<sub>PW8</sub>, passamos a desenvolver a etapa de identificação da proteína recombinante através de ensaios de antigenicidade pela técnica de *immunoblotting*. Dessa maneira, utilizamos um antisoro policlonal produzido a partir do toxóide diftérico, avaliado inicialmente em diferentes diluições. Dessa avaliação, o soro diluído até 1/500 foi capaz de reconhecer a proteína. A afinidade do DTBr<sub>PW8</sub> pelo antisoro foi reconhecida em concentrações entre 0,7 µg/µL e 28 µg/µL, evidenciando a sensibilidade e a especificidade do antisoro para a proteína de interesse. Logo, estes dados permitem indicar que a expressão heteróloga do gene *dtb* em sistemas procarióticos permitiu a obtenção da proteína DTBr<sub>PW8</sub> desprovida da porção tóxica da molécula de toxina diftérica e poderá auxiliar na produção e purificação de polipeptídeos imunogênicos, através do uso de sistemas de expressão comerciais amplamente conhecidos. As propriedades antigênicas e imunogênicas da proteína DTBr<sub>PW8</sub> foram avaliadas em camundongos e coelhos, os resultados da soroconversão específica para anticorpos IgG circulante foram produzidos através dos ensaios de ELISA. Os animais responderam a imunização com a proteína recombinante, entretanto, enquanto a resposta imune humoral foi de aproximadamente (20 unidades/mL) em camundongos 60 dias após a imunização, uma alta resposta (150 unidades/mL) foi observada em coelhos 21 dias após a imunização. De fato, estes resultados sugerem que camundongos são menos sensíveis para DT do que coelhos (Formiga, 1986; World Health Organization, 1993). O primeiro ensaio *in vivo* para a determinação da virulência do bacilo da difteria foi descrito por Fraser em 1931. O teste é muito sensível e é baseado nos níveis de antitoxina encontrados na pele de coelhos imunizados ou não com a vacina antidiftérica. Esse método, foi adequado para demonstrar que os níveis de antitoxina presentes na pele do coelho imunizado com a proteína DTBr<sub>PW8</sub> foram capazes de uma resposta neutralizante contra a ação de cepas toxigênicas *in vivo* incluindo a cepa homóloga de *C. diphtheriae* PW 8 e, portanto, conferiram atividade soroneutralizante *in vivo* quando comparado ao animal não imunizado. A eficácia da neutralização da toxina diftérica através da reação dermonecrotica em coelhos imunizados com DTBr<sub>PW8</sub> foi realizada através de leitura visual até 120 horas. Paralelamente, também foi realizada a análise da sequência de aminoácidos da

proteína DTB<sub>rPW8</sub> revelando peptídeos presentes na proteína com grande potencial imunogênico através do software TEPITOPE perfil MHC-II (Brusic *et al*, 1998) e a localização na molécula pelo programa ANTHEPROT (Deléage *et al*, 2001). Foram identificados peptídeos na molécula: (I) Bem reconhecidos por alelos HLA moléculas de MHC de classe II e (II) bem expostos na molécula. Essas características ressaltam o interesse em continuar investigando o potencial desta proteína *in vivo*.

Conforme ressaltado na introdução deste trabalho, a vacina BCG apresenta vantagens particularmente em virtude de comportar-se como um dos melhores adjuvantes para a indução de resposta humoral e celular, de baixo custo de produção e termoestabilidade (Cirillo *et al*, 1995; Gicquel, 1995; Ohara *et al*, 2001; Mazzantini *et al*, 2004; Singh *et al*, 2013), além de não reverter a virulência e proteger contra o desafio com a espécie virulenta de *M. bovis* (Gicquel, 1995; Dean *et al*, 2013). Block e Segal (1955) verificaram que vacinas com *M. bovis* BCG morto conferiam menos proteção em camundongos do que vacinas com o bacilo vivo. A vacina BCG por ser atenuada, ainda secreta elementos que conferem proteção às formas mais graves da doença, principalmente nos primeiros anos de vida. Com o surgimento da era genômica a expressão de antígenos heterólogos em micobactérias tem sido realizada com diferentes vetores de expressão e diferentes antígenos bacterianos, virais, de protozoários, helmintos e de citocinas (da Silva *et al*, 2008; Liu *et al*, 2009; Sugawara *et al*, 2009; Bonaldo *et al*, 2010). Para o desenvolvimento do BCG<sub>r</sub>, devem ser criteriosamente considerados os tipos de plasmídeo replicativo ou integrativo a serem utilizados, o nível de atividade da região promotora responsável pela expressão do gene *dtb*, além da utilização de sequências sinais para o direcionamento do produto da expressão do gene *dtb* em compartimentos celulares ou extracelulares. Além da escolha da sub-cepa vacinal, deve ser também considerada a estabilidade funcional e estrutural das construções geradas para a modificação da cepa vacinal comercial em BCG<sub>r</sub>, sem deixar de ressaltar as vias e as doses de administração da vacina. Finalmente, o modelo animal, no qual o protótipo vacinal será testado, também constitui uma etapa crítica para a avaliação dos candidatos vacinais, assim como, uma estratégia para o esquema de vacinação mais efetiva (Kaufmann *et al*, 1999; Kaufmann, 2006; Matsuo and Yasutomi, 2011). Todos estes parâmetros influenciam no mecanismo de permanência do BCG<sub>r</sub> no organismo do hospedeiro, bem como na natureza e persistência da resposta imune induzida (Kaufmann, 2010; Desel *et al*, 2011). Os

resultados da presente investigação permitem ampliar dados relativos à busca de protótipos vacinais alternativos contra a difteria (Dias *et al*, 2001). Os dados poderão contribuir para o avanço da tecnologia do BCGr, como base para o desenvolvimento de vacinas multivalentes.

Os dados obtidos na segunda etapa de experimentos deste estudo demonstraram que a cepa vacinal de *M. bovis* BCG Moreau, utilizada no Brasil pode ser empregada como vetor de expressão do gene *dtb* quando utilizada (Benévolo-de-Andrade *et al*, 2005). O vetor micobacteriano bifuncional (pUS977) de expressão citoplasmática foi construído a partir do vetor comercial pUC18, que apresenta as seguintes composições estruturais: gene de resistência a canamicina derivado do componente de elemento genético móvel, o transposon TN903 (Grindley *et al*, 1980); origem de replicação micobacteriana do plasmídeo pAL5000 de *M. fortuitum* (Labidi *et al*, 1985); promotor  $P_{AN}$  de *M. paratuberculosis* (Murray *et al*, 1992). Em nossos estudos a utilização do promotor  $P_{AN}$ , permitiu a expressão da proteína de interesse. O promotor  $P_{AN}$  foi descrito por Murray e colaboradores (1992) que demonstraram a expressão do gene *lacZ* que codifica para  $\beta$ -galactosidase, seguida de uma forte indução da resposta imune celular e humoral em murinos. Outros investigadores (Medeiros *et al*, 2002) demonstraram através de estudo comparativo a expressão de *lacZ* em BCG sob ação deste promotor e observaram níveis menores de expressão com o promotor  $P_{AN}$ . Além de  $P_{AN}$ , outros promotores micobacterianos foram descritos em diferentes espécies de micobactérias (Mulder *et al*, 1997), os mais utilizados para a expressão de genes heterólogos em BCG são *hsp60*, *p18kDa*, *hsp70*, *p19kDa*, *pBla<sup>+</sup>* e *groES/EL1*. Miyaji e colaboradores 2001 em estudo semelhante fusionaram um gene mutante da toxina diftérica (CRM 197) ao promotor *pBla<sup>+</sup>*. Os autores descrevem o sucesso da expressão da proteína recombinante em cepa de BCG Moreau, usada para gerar as cepas de BCGr (Miyaji *et al*, 2001). Posteriormente, a mesma construção (*pBla<sup>+</sup>CRM<sub>197</sub>*), foi utilizada para fusionar o gene C da toxina tetânica para expressão em cepa de BCG Moreau e neste caso a expressão das proteínas recombinantes foram encontradas em níveis comparados aos das formas nativas (Mazzantini *et al*, 2004). A semelhança de Miyaji e colaboradores, os ensaios de SDS-PAGE e identificação da proteína por *immunoblotting* demonstraram que a cepa de BCGr pUS977*dtb*<sub>pw8</sub> foi capaz de expressar a proteína DTB produzida a partir da cepa vacinal PW8, permitindo a continuidade dos estudos *in vitro* e *in vivo*. A resposta imune humoral induzida em

camundongos imunizados com a cepa modificada (BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub>), revelou a produção de anticorpos capazes de reconhecer o toxóide diftérico. Esses dados demonstram também que o gene *dtb* clonado no vetor pUS977 foi adequadamente apresentado ao sistema imune o que o torna um excelente candidato para apresentação de epítópos heterólogos (Dellagostin *et al*, 1993; Dias *et al*, 2001).

Outro passo deste trabalho que compõe a terceira fase deste estudo foi verificar a estabilidade dos plasmídeos recombinantes que pode ser representada por duas linhas de estudo, a estabilidade funcional e a estrutural (Summers, 1993; Corbel, 1996), realizadas *in vitro* e *in vivo*. A estabilidade funcional tem sido bastante estudada, pois está associada com a capacidade da célula hospedeira de manter, ou não, em seu ambiente intracelular o DNA plasmidial. Do ponto de vista da biotecnologia e da produção de moléculas em escala industrial a capacidade do plasmídeo que carrega o gene heterólogo de permanecer no ambiente interior do sistema hospedeiro constitui um aspecto vital (Kumaer *et al*, 1991). Este estudo leva em conta fatores tais como: o número de cópias do plasmídeo dentro do hospedeiro; - presença utilização de genes de resistência a antibióticos como marcadores de seleção; - presença de cepas mutantes “suicidas” (células morrem sem o plasmídeo; Hershberger & Rosteck, 1991; Tacket *et al*, 1997); controle das condições de cultivo; lisógenos e mutantes auxotróficos. Baseados nestes dados, foi realizada a análise da estabilidade funcional da construção BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> até duas passagens *in vitro* (30 e 60 dias), através de ensaios de *immunoblotting*. Os dados obtidos com os resultados dos experimentos de recuperação do BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> em esplenócitos de camundongos vacinados forneceram informações sobre a capacidade do BCG modificado (BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub>) ou não modificado de infectarem e persistirem *in vivo*. Outros aspectos importantes foram em relação à manutenção do plasmídeo pela cepa de BCG na ausência de pressão seletiva. Assim como, a estabilidade funcional e estrutural obtidas através do crescimento das colônias do BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> oriundas dos esplenócitos de camundongos. Em estudo semelhante, Medeiros e colaboradores (2005), analisaram a resposta imune do BCGr expressando a subunidade S1 da toxina de pertussis com este vetor e demonstraram que o promotor  $P_{AN}$  foi capaz de regular a expressão da proteína recombinante e modular a resposta imune para a produção de anticorpos. Contudo, os autores demonstraram que nem sempre o promotor eficiente em atividade de expressão é o mais adequado para o direcionamento da resposta imune. De fato, a



expressão da proteína *in vitro* nem sempre se correlaciona aos resultados *in vivo* (Stover, 1993). Um estudo semelhante onde foram analisados 5 clones de BCGr pUS977sm14 (gene *sm14* de *Schistosoma mansoni*), potencial candidato a integrar uma vacina contra esquistossomose, nenhum dos clones testados demonstraram alterações na estrutura do DNA plasmidial quando expressos na sub-cepça Pasteur (Argondizzo, 2005). O antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg), proteínas Middle S e Large S, também foram expressas eficientemente em níveis equivalentes sob o controle do promotor  $P_{AN}$  e a estabilidade estrutural *in vitro* e *in vivo* foram confirmadas (Rezende *et al*, 2005). No presente estudo, a estabilidade estrutural observada com a construção BCGr pUS977dtb<sub>pw8</sub> demonstrou ser satisfatória, nenhuma modificação acentuada foi detectada no plasmídeo recuperado dos cultivos do BCGr pUS977dtb<sub>pw8</sub> e *E. coli*. Esta construção demonstra ser adequada por se manter estável antes e após o congelamento do cultivo celular. Com o objetivo de avaliar a persistência intracelular do BCG modificado. Camundongos BALB/c foram vacinados com a cepça modificada, com a cepça modificada inativada e não modificada por 30 e 60 dias. Os resultados obtidos mostraram que o BCGr pUS977dtb<sub>pw8</sub> persistiu até 60 dias na presença ou não de pressão seletiva e a viabilidade do BCGr pUS977dtb<sub>pw8</sub>, embora inferior ao do BCG não modificado, não sofreu alteração significativa durante o período testado, mesmo se considerarmos que a persistência observada ocorreu também na ausência de pressão seletiva, que é crítica para a manutenção de vetores extracromossomais como o pUS977 (Medeiros *et al*, 2005; Rezende *et al*, 2005; Seixas *et al*, 2007). A presença do gene *dtb* no BCG isolado dos esplenócitos de camundongos BALB/c com 30 e 60 dias após a vacinação foi confirmada através dos ensaios de PCR. Esta é uma questão fundamental para a manutenção do gene alvo na cepça transformada, mesmo após a vacinação. O grau de infecção e persistência intracelular da cepça modificada em células de monócitos humano (linhagem THP-1) foi realizada em dois experimentos independentes, na presença ou não de pressão seletiva. Os resultados mostraram que houve sobrevivência no ambiente intracelular até 12 dias em níveis equivalentes quando comparados com o BCG não modificado, sugerindo que o grau de infecção e persistência do BCGr pUS977dtb<sub>pw8</sub> foi positiva, esta é uma evidencia de que este antígeno não é tóxico para os monócitos humanos.

A toxina difterica tem a capacidade de bloquear a síntese de proteínas em culturas de células de mamíferos, e, portanto, causa a morte celular. O teste de

neutralização *in vitro* foi realizado para determinar o título de anticorpos, utilizando células Vero. A soroneutralização *in vitro* é o método empregado na avaliação da capacidade soroneutralizante induzida pelas vacinas DTP/WHO (World Health Organization, 1993), a análise de anticorpos que potencialmente seja neutralizante é aferida através de UI (unidades internacionais por mL) do soro. Baseado nisso, em estudo preliminar um ensaio de células Vero foi padronizado e validado para a estimativa da potência dos soros de camundongos imunizados com o BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> (60 dias). Sendo assim, os resultados obtidos com os soros de camundongos previamente imunizados foram de 1,984 UI/mL e de 0,992 UI/mL para a vacina DTP utilizada como controle positivo. Estas avaliações foram repetidas utilizando placas para cultura de células com 48 cavidades, em tais condições os resultados acima foram reproduzíveis, a ação citotóxica da toxina diftérica foi neutralizada entre as diluições de 1/4 e 1/16 dos soros imunes dos camundongos imunizados com o BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub>. A leitura foi feita visualmente observando-se os orifícios com aproximadamente 50% de coloração. Os títulos dos soros foram dados pelo inverso da diluição do soro (orifício com 50% de células coradas) multiplicado pelo título do soro de referência (Miyamura *et al*, 1974). Todos os ensaios também foram analisados por meio de microscopia óptica (MO). Entretanto, outro aspecto deve ser considerado: a interpretação do teste é dada de forma subjetiva por meio de observação visual e microscopia ótica (MO), o que pode gerar resultados falsos negativos. Por isso, padronizamos os protocolos para a avaliação da absorbância da capacidade soroneutralizante do BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> em células VERO (Aggerbeck & Heron, 1991). O ensaio realizado com células Vero teve o objetivo de determinar a antitoxina diftérica presente nos soros testados, através de um ensaio por determinação espectrofotométrica do ponto de equivalência entre a toxina e antitoxina. A seguir, análise de computador dos valores de absorção foi realizada. Este método foi mais preciso do que a leitura visual e tornou a análise das amostras muito mais fácil. Esta análise é importante para interpretar um ponto positivo de um ponto negativo e melhorar, portanto, a interpretação dos resultados obtidos na análise subjetiva. Sendo assim, as intensidades de cores foram semelhantes com a análise subjetiva onde o soro de camundongos imunizados com o BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> com sessenta dias, foi capaz de inibir o efeito citotóxico da toxina diftérica na diluição de 1/4. Assim como os controles DTP e SAD.

O presente estudo criou uma base tecnológica para a produção do fragmento B da toxina diftérica, purificado a partir de *E. coli* que foi útil para este ou outros estudos relacionados e permitiu avaliar o potencial da vacina BCG como vetor de expressão de um antígeno de *C. diphtheriae*. O sucesso de investigações futuras representará uma importante contribuição para o avanço da tecnologia do BCG recombinante, como veículo para o desenvolvimento de vacinas multivalentes e gerará subsídios para a busca de uma vacina alternativa contra a difteria de modo a favorecer a redução de efeitos indesejáveis decorrentes da imunização com a vacina clássica DTP, incluindo o aumento dos níveis de anticorpos IgE e IgG<sub>4</sub>, comumente detectados em quadros de doenças atópicas (Nagel *et al*, 1977; Nilsson *et al*, 1998; Grüber *et al*, 2001).

O *M. bovis* (BCG), tem sido proposto como um vetor vivo eficaz para o desenvolvimento de vacinas multivalentes. Entretanto, os vetores utilizados na clonagem de micobactérias dependem de genes de resistência a antibióticos como marcadores selecionáveis, o que na prática os tornam indesejáveis para qualquer vacina (Borsuk *et al*, 2007). Contudo, para solucionar isso alguns grupos investem em complementação auxotrófica como marcador de seleção independente de genes de resistência a antibióticos podendo ser adequada, para uso em vacina recombinante. Um BCG auxotrófico para o aminoácido leucina foi construído por *knocking out* para o gene *leuD* por recombinação homóloga. A expressão do gene *leuD* não somente permitiu a complementação mais também funciona como um marcador de seleção (Borsuk *et al*, 2007). As principais vantagens deste sistema é manter a seleção ativa *in vivo* e não requer o marcador de seleção para antibiótico como um componente do vetor (Borsuk *et al*, 2007). Seixas e colaboradores (2010) também descreveram a construção de um sistema de expressão para BCG por meio da complementação auxotrófica como um marcador selecionável. Neste estudo, os antígenos LipL32 e LigAni de *Leptospira interrogans* foram clonados e expressos em *M. bovis* BCG Pasteur e no BCG auxotrófico. A complementação auxotrófica foi altamente estável *in vitro* e *in vivo*, enquanto no vetor convencional foi instável na ausência de pressão seletiva. Finalmente, este novo sistema permitirá a construção de cepas de vacina recombinante utilizando vetores plasmídiais multicópias estáveis sem a inclusão de marcadores de resistência aos antibióticos (Chapman *et al*, 2012; Chege *et al*, 2013).

## 5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Além da padronização dos principais protocolos que utilizamos neste estudo, as etapas correspondentes aos objetivos específicos foram concluídas.

- a) Contudo, é necessário revalidar o ensaio da análise quantitativa das unidades (concentrações) necessárias para a soroneutralização da toxina diftérica em células VERO. O ensaio de soroneutralização recomendado por World Health Organization é mais efetivo e qualitativo – *Gold standart*;
- b) A avaliação da resposta imune celular através dos ensaios de FACS para o BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> e a proteína DTBr<sub>pw8</sub> serão objetivos de nossos estudos;
- c) Moléculas de DTBr<sub>pw8</sub> serão submetidas a análises de atividades biológicas diversas ocorridas durante o estabelecimento e o desenvolvimento de processos infecciosos causados pelo *C. diphtheriae*. A influência do DTB nas propriedades adesivas e invasivas do *C. diphtheriae*, conforme descrito por (Moreira *et al*, 2003; Hirata Jr *et al*, 2004; Hirata Jr *et al*, 2002), serão alvos de nossos estudos;
- d) Avaliaremos o potencial discriminativo da proteína DTBr<sub>pw8</sub> com soro humano de indivíduos doentes ou tratados para difteria visando o potencial da proteína recombinante como um reagente para diagnóstico (imunodiagnóstico);
- e) Desenvolvimento de um ensaio para a detecção da toxina diftérica baseado no Lateral Flow test para uma rápida identificação do *C. diphtheriae* utilizando a proteína recombinante DTBr<sub>pw8</sub>;
- f) O sucesso desta investigação representará uma importante contribuição para o avanço celular e molecular do DTBr<sub>pw8</sub>. Por fim, demonstra a viabilidade da produção e purificação de polipeptídeos imunogênicos, através do uso de sistema de expressão comercial amplamente conhecido.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente estudo permitem chegar as seguintes conclusões:

- a) Através da engenharia genética foi possível isolar o DNA da cepa vacinal de *C. diphtheriae* PW8, dando origem ao gene *dtb*;
- b) A sequência de DNA codificando o gene *dtb* foi clonada no vetor pQE-30 (sistemas de expressão procariótica). Produzindo o proteína imunogênica DTBr<sub>pw8</sub> em escala laboratorial;
- c) A análise do perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE revelou que a proteína recombinante obtida apresentou uma banda com aproximadamente 40 kDa de peso molecular correspondente ao da molécula íntegra;
- d) A etapa de identificação da proteína recombinante DTBr<sub>pw8</sub> foi realizada através de ensaios de antigenicidade pela técnica de *Immunoblotting*, utilizando anticorpo policlonal anti-toxóide diftérico. Resolução e boa reprodutibilidade demonstraram que a proteína alvo foi eficientemente expressa;
- e) As propriedades antigênicas e imunogênicas da proteína DTBr<sub>pw8</sub> foram avaliadas em camundongos e coelhos e a soroconversão específica para anticorpos IgG circulante foram produzidas;
- f) A eficácia da neutralização da toxina diftérica foi realizada através da reação dermonecrótica em coelhos imunizados com a proteína alvo DTBr<sub>pw8</sub>. Os níveis de antitoxina presentes na pele do coelho imunizado conferiram atividade soroneutralizante *in vivo* contra a ação de cepas toxigênicas. Incluindo a cepa homóloga de *C. diphtheriae* PW8;
- g) A sequência de DNA codificando o gene *dtb* foi clonada no vetor micobacteriano bifuncional (pUS977) de expressão citoplasmática, permitindo o direcionamento do antígeno expresso através do promotor  $P_{AN}$ ;
- h) Os ensaios de SDS-PAGE e identificação da proteína por *immunoblotting* demonstraram que a cepa de BCGr pUS977 *dtb*<sub>pw8</sub> foi capaz de expressar a proteína DTB produzida a partir da cepa vacinal PW 8;

- i) A resposta imune humoral induzida em camundongos BALB/c imunizados com a cepa BCGr pUS977*dtb*<sub>pw8</sub>, revelou a produção de anticorpos capazes de reconhecer o toxóide diftérico;
- j) Através dos subcultivos das culturas do BCGr pUS977*dtb*<sub>pw8</sub>, foi possível confirmar a estabilidade funcional da construção em BCG até sessenta dias (duas passagens), 72 gerações;
- k) Através dos ensaios de eletrotransformação para *E.coli*, utilizando DNAs recuperados dos cultivos de BCGr pUS977*dtb*<sub>pw8</sub> demonstramos que o vetor pUS977 foi capaz de se manter estável *in vitro* não demonstrando a ocorrência de deleção ou mutação na construção (pUS977*dtb*<sub>pw8</sub>). Esta construção demonstra ser adequada por se manter estável antes e após o congelamento do cultivo celular;
- l) O grau de infecção e persistência intracelular do BCGr pUS977*dtb*<sub>pw8</sub> em células de monócitos humano (linhagem THP-1) foi realizada em dois experimentos independentes, na presença ou não de pressão seletiva. O grau de infecção e persistência do BCGr pUS977*dtb*<sub>pw8</sub> foi positiva;
- m) Em estudo preliminar, um ensaio de células Vero foi padronizado e validado. O *pool* dos soros de camundongos imunizados com o BCGr pUS977*dtb*<sub>pw8</sub> (60 dias) foi aferido, a ação citotóxica da toxina diftérica foi neutralizada entre as diluições dos soros imunes de 1/4 e 1/16.
- n) Finalmente, em nosso estudo foi possível avaliar o potencial da vacina BCG como vetor de expressão de um antígeno de *C. diphtheriae* *in vitro* e *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- Abdelhak S, Louzie H, Timm J. Recombinant BCG expressing the Leishmania surface antigen gp 63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in Balb/c Mice. *Microbiology*, 1995; 141: 1585-1592.
- Abomoelak B, Huygen K, Kremer L, Turneer M, Loch C. Humoral and cellular immune responses in mice immunized with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein. *Infect Immun*, 1999; 67: 5100-5105.
- Adler NR, Mahony A, Friedman ND. Diphtheria: forgotten, but not gone. *Inter Med J*, 2013; 43: 206-210.
- Aggerbeck H, Heron I. Improvement of a Vero cell assay to determine diphtheria Antitoxin content in sera. *Biologicals*, 1991; 19: 71-76.
- Aguila A, Donachie AM, Peyre M, McSharry CP, Sesardic D, Mowat A Mcl. Induction of protective and mucosal immunity against diphtheria by a immune stimulating comple (ISCOMS) based vaccine. *Vaccine*, 2006; 24: 5201-5210.
- Aldovani A, Young RA. Humoral and cell mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature*, 1991; 351: 479-482.
- Aldovani A, Young RA. Development of a BCG recombinant vehicle for candidate AIDS. *Inter Immunol*, 1990; 7(1): 79-83.
- Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kanekiyo M, Horibata S. Priming-boosting vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin and a nonreplicating vaccinia virus recombinant leads to long-lasting and effective immunity. *J Virol*, 2005; 79: 12871-12879.
- Anderson JJ, O'Neil A, Woodworth T, Haddad J, Sewell KL, Moreland I and LW. Health status response of rheumatoid arthritis to treatment with DAB486IL-2. *Arthritis Care Res*, 1996; 9: 112-119.
- Argondizzo APC. Construção do *M. bovis* BCG recombinante Sm14r e avaliação da sua capacidade protetora contra Esquistossomose no modelo murino. Dissertação de mestrado grau de mestre em Biologia Parasitária. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2005.
- Aristequi J, Usonis V, Riedemann S, Win KM, Gatchalian S, Bock HL. Facilitating the WHO expanded program of immunization: the clinical profile of a combined diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae type b vaccine. *Int J Infect Dis*, 2003; 7: 143-151.
- Arnold J, de Boer EC, O'Donnell MA, Bohle A, Brandau S. Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon-gamma. *J Immunother*, 2004; 27: 116-123.

Arnold J, de Boer EC, O'Donnell MA, Bohle A, Brandau S. Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon-gamma. *J Immunother*, 2004; 27: 116-123.

Beláková J, Krupka M, Šebestová M, Tuháčková J, Vrzal V, Raška M, Weigl E. Preparation and purification of recombinant outer surface protein A (rOspA) of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005; 149: 257-259.

Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LR. BCG Moreau Rio de Janeiro – An oral vaccine against tuberculosis – Review. *Mem Instituto Oswaldo Cruz*, 2005; 100: 459-465.

Bennett MJ, Eisenberg D. Domain swpping: entanglig alliances between proteins. *Protein Science*, 1994; 3: 1464-1475.

Berger A, Lensing C, Konrad R, Huber I, Hogardt M, Sing A. Sexually transmitted diphtheria. *Sex Transm Infect*, 2013; 89: 100-101.

Bergfors E, Trollfors B. Sixty-four children with persistent itching nodules and contact allergy to aluminium after vaccination with aluminium-adsorbed vaccines-prognosis and outcome after booster vaccination. *Eur J Pediatr*, 2013; 172: 171-177.

Berrêdo-Pinho M, Kalume DE, Correa PR, Gomes LH, Pereira MP, da Silva RF, Castello-Branco LR, Degraive WM, Mendonça-Lima L. Proteomic profile of culture filtrate from the Brazilian vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Moreau compared to *M. bovis* BCG Pasteur. *BMC Microbiololy*, 2011; 20: 11-80.

Biet F, Kremer L, Wolowczuk I, Delacre M, Loch C. *Mycobacterium bovis* BCG producing interleukin-18 increases antigen-specific gamma interferon production in mice. *Infect Immun*, 2002; 70: 6549-6557.

Biet F, Duez C, Kremer L, Marquillies P, Amniai L, Tonnel AB. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing IL-18 reduces IL-5 production and bronchoalveolar eosinophilia induced by an allergic reaction. *Allergy*, 2005; 60: 1065-1072.

Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol*, 2002; 10: 45-52.

Bloch H, Segal W. Viability and multiplication of vaccines in immunization against tuberculosis. *The American review of tuberculosis*, 1955; 71(20): 228-248.

Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, American Society for Microbiology, Washington, 1994; p. 531-557.

Bodley JW. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 832.



Björkholm B, Böttiger M, Christenson B, Hagberg L. Antitoxin antibody levels and the outcome of illness during an outbreak of diphtheria among alcoholics. *Scand J Infect Dis*, 1986; 18: 235-239.

Bonaldo MC, Martins MA, Rudersdorf R, Mudd PA, Sacha JB, Piaskowski SM, Neves PCC, Veloso de Santana MG, Vojnov L, Capuano III S, Rakasz EG, Fulkerson J, Sadoff JC, Watkins DI, Galler R. Recombinant yellow fever vaccine virus 17D expressing simian immunodeficiency virus SIVmac239 Gag Induces SIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2010; 84: 3699-3706.

Borsuk S, Mendum TA, Fagundes MQ, Michelon M, Cunha CW, Macfadden J, Dellagostin OA. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. *Tuberculosis*, 2007; 87: 474-480.

Boyd J, Oza MN, Murphy JM. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (dtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Nat Acad Sci*, 1990; 87: 5968-5972.

Brdar B, Matulić M, Rubelj I, Ivanković M, Reich E. Human immunodeficiency virus-1 tat and tat/nef-defective genomes containing HIV regulated diphtheria toxin A chain gene inhibit HIV replication. *Croat Med J*, 2002; 43: 591-597.

Brusic V, Rudy G, Honeyman G, Hammer J, Harrison L. Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network. *Bioinformatics*, 1998; 14: 121-130.

Bueno SM, Gonzalez PA, Cautivo KM, Mora JE, Leiva ED, Tobar HE. Protective T cell immunity against respiratory syncytial virus efficiently induced by recombinant BCG. *Proc Nat Acad USA*, 2008; 105: 20822-20827.

Byard RW. Diphtheria - 'The strangling angel' of children. *J For Leg Med*, 2013; 20: 65-68.

Cabiaux V, Phalipon A, Wattiez R, Falmagne P, Ruyschaert JM, Kaczorek M. Expression of a biologically active diphtheria toxin fragment B in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1988; 2: 339-346.

Cai J, Zheng T, Murphy J, Wetters CA, Lin GY, Gill PS. IL-4 expression in AIDS-KS cells and response to rhIL-4 and IL-4 toxin (DAB<sub>389</sub>-IL-4). *Invest New Drugs*, 1997; 15: 279-287.

Cardenas R, Prieto G, Vargas J, Martinez A. *Corynebacterium diphtheriae* características de cepas aisladas recientemente em Maracaibo-Venezuela. *Kasmera*, 1972; 4: 185-198.

Cayabyab MJ, Koriath-Schmitz B, Sun Y, Carville A, Balachandran H, Miura A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG prime-recombinant adenovirus boost vaccination in rhesus monkeys elicits robust polyfunctional simian immunodeficiency virus-specific T-cell responses. *J Virol*, 2009; 83: 5505-5513.

Cerdeño-Tárraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M, Bentley SD, Besra GS, Churcher C, James KD, De Zoysa A, Chillingworth T, Cronin A, Dowd L, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford KM, Thomson NR, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Parkhill J. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucl Acids Res*, 2003; 15:31(22): 6516-6523.

Cirillo JD, Stover CK, Bloom BR, Jr Jacobs WR, Barletta RG. Bacterial vaccine vectors and bacillus Calmette-Guerin. *Clin Infect Dis*, 1995; 20: 1001-1009.

Cha SH. The history of vaccination and current vaccination policies in Korea. *Clin Exp Vac Res*, 2012; 1: 3-8.

CHANG MP, BALDWIN RL, BRUCE C, WISNIESKI BJ. Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity. *Science*, 1989; 246: 1165-1167.

Chapman R, Shephard E, Stutz H, Douglass N, Sambandamurthy V, Garcia I, Ryffel B, Jacobs R, Williamson AL. Priming with a recombinant pantothenate auxotroph of *Mycobacterium bovis* BCG and boosting with MVA elicits HIV-1 Gag specific CD8+ T cells. *PLoS One*, 2012; 7(3) e32769: 1-11.

Chege GK, Burgers WA, Stutz H, Meyers A, Chapman R, Kiravu A, Bunjun R, Shephard EG, Jacobs WR Jr, Rybicki EP, Williamson AL. Robust immunity to an auxotrophic BCG-VLP prime-boost HIV vaccine candidate in a non-human primate model. *J Virol*, 2013; 87: 5151-5160.

Chellapandi P, Sakthilshree S, Bharathi M. Phylogenetic approach for inferring the origin and functional evolution of bacterial ADP-ribosylation superfamily. *Prot Pep Lett*, 2013; 20: 1054-1065.

Chevalier MF, Nardelli-Haeffliger D, Domingos-Pereira S, Jichlinski P, Derré L. Immunotherapeutic strategies for bladder cancer. *Hum Vac Immunoth*, 2014; 2: 10(4).

Claridge JE, Sprigel CA. *Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix* and *Gardnerella*. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Washington, 1995; 6th edition, p. 357-373.

Clemens SAC, Azevedo T, Homma A. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) brasilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4 and 6 months of age. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2003; 36: 321-333.

Collier RJ. Diphtheria toxin: Mode of action and Structure. *Bacteriol Rev*, 1975; 39 (1): 54-85.

Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90(24): 11473-11477.

Conradt P, Hess J, Kaufmann SH. Cytolytic T-cell response to human dendritic cells and macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG and recombinant BCG secreting listeriolysin. *Microb Infect J*, 1999; 1 (10): 753-764.

Convit J, Aranzazu MU. Immunotherapy with a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG in different forms of leprosy and Mitsuda negative contacts. *Inter J Lepr*, 1982; 50: 514-523.

Coyle MB, Tompkins LS. Corynebacteria. *In*: Lennette, EH, Balowns A, Hansler WJ Jr. & Truant JP. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, 1980; 3<sup>rd</sup> edition, p. 131-138.

Corbel MJ. Reasons for instability of bacterial vaccines. *Dev Biol Stand*, 1996; 87: 113-124.

Cunha MP, Dorea JG, Marques RC, Leao RS. Vaccine adverse events reported during the first ten years (1998-2008) after introduction in the state of Rondonia, Brazil. *Biomed Res Int*, 2013; 2013: 853083.

da Silva Ramos RA, Conceição FR, Grassmann AA, Lagranha VL, Dellagostin OA. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. *Can J Microbiol*, 2008; 54: 677-686.

da Cruz FW, McBride AJ, Conceição FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice. *Vaccine*, 2001; 20: 731-736.

Dai W, Gao H, Huang H, Hu J, Huangfu Y. Comparative study on the immunogenicity between recombinant MS-Sj26GST vaccine and recombinant BCG-Sj26GST vaccine in *Schistosoma japonicum*. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2003; 23: 213-215.

Damasco PV, Pimenta FP, Filardy AA, Brito SM, Andrade AF, Lopes GS, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. Prevalence of IgG diphtheria antitoxin in blood donors in Rio de Janeiro. *Epidemiol Infect*, 2005; 133: 911-914.

Dean G, Whelan A, Clifford D, Salguero FJ, Xing Z, Gilbert S, McShane H, Hewinson RG, Vordermeier M, Villarreal-Ramos B. Comparison of the immunogenicity and protection against bovine tuberculosis following immunization

by BCG-priming and boosting with adenovirus or protein based vaccines. *Vaccine*, 2014; 32 (11): 1304–1310

Dellagostin OA. Transformação: uma Ferramenta para o estudo de micobactérias. VI Simpósio Nacional de Micobactérias. Vitória-ES 1995, p. 1-15.

Dellagostin OA, Wall S, Norman E. Construction and use of integrative vectors to express foreign antigens in *Mycobacteria*. *Mol Microbiol*, 1993; 10: 983-993.

Deléage G, Combet C, Blanchet C, Geourjon C. ANTHEPROT: An integrated protein sequence analysis software with client server capabilities. *Comp Biol Med*, 2001; 31: 259-267.

Desel C, Dorhoi A, Bandermann S, Grode L, Eisele B, Kaufmann SHE. Recombinant BCG  $\Delta$  ureC hly1 induces superior protection over parental BCG by Stimulating a balance combination of type 1 and type 17 cytokine responses. *J Infect Dis*, 2011; 204: 1573-1584.

Demangel C, Garnier T, Rosenkrands I, Cole ST. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infect Immun*, 2005; 73: 2190-2196.

Dennehy M, Bourn W, Steele D, Williamson AL. Evaluation of recombinant BCG expressing rotavirus VP6 as an anti-rotavirus vaccine. *Vaccine*, 2007; 25: 3646-3657.

De Zoysa A, Efstratiou A, George RC, Jahkola M, Vuopio-Varkila J, Deshevoi S, Tseneva G, Rikushin Y. Molecular epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from Northwestern Russia and surrounding countries studied by using ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 1080-1083.

Dhar N, Rao V, Tyagi AK. Immunogenicity of recombinant BCG vaccine strains overexpressing components of the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Microbiol Immunol*, 2004; 193: 19-25.

Dias AASO, Silva Jr FC, Pereira GA, Souza MC, Camello TCF, Damasceno JALD, Pacheco LGC, Miyoshi A, Azevedo VA, Hirata Jr R, Bôas MHSV, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vect Bor Zoonot Dis*, 2010; 10: 743-748.

Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EM, Nascimento IP, Leite LCC. Vacinas de BCG Recombinante-DTP. *Biot Ciênc & Desenv*, 2001; 24-28.

Dinelli MI, Fisberg M, de Moraes-Pinto MI. Tetanus and diphtheria immunity in adolescents from São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 2007; 40: 259-263.

Ding X, Zeng H, Schiering N, Ringe D, Murphy JR. Identification of the primary metal ion-activation sites of the diphtheria toxin repressor by x-ray crystallography and site-directed mutational analysis. *Nat Struct Biol*, 1996; 3: 382-387.

Dittman S, Wharton M, Vitek C, Ciotti M, Galazka A, Guichard S, Hardy I, Kartoglu U, Koyama S, Kreysler J, Martin B, Mercer D, Ronne T, Rouce C, Steinglass R, Strebel P, Sutter R, Trostle M. Successful control of epidemic diphtheria in the State of former Union of Soviet Socialist Republics: lessons learned. *J Infect Dis*, 2000; 181: S10-20.

Divino-Goes KG, de Moraes-Pinto MI, Dinelli MIS, Casagrande ST, Bonetti TCS, Andrade PR, Weckx LY. Prevalence of diphtheria and tetanus antibodies and circulation of *Corynebacterium diphtheriae* in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 2007; 40: 1681-1687.

Drazin R, Kandel J, Collier RJ. Structure and activity of diphtheria toxin. *J Biol Chem*, 1971; 246(5): 1504-1510.

Edelman R, Palmer K, Russ KG. Safety and immunogenicity of recombinant bacille Calmette-Guérin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate Lyme disease vaccine. *Vaccine*, 1999; 17: 904-914.

Efstratiou A, Engler KH, Dawes CS, Sesardic D. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 3173-3177.

Efstratiou A, George RC. Screening tests for the presumptive identification of *Corynebacterium diphtheriae* in a diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol*, 1996; 34(12): 3251-3252.

Efstratiou A, George R, Begg NT. Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* var *gravis* in England. *Lancet*, 1993; 341: 1592-1593.

Engler KH, Kozlov RS, Copping SJ, Members of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Efstratiou A. International external quality assessment scheme for the laboratory diagnosis of diphtheria. *J Med Microbiol*, 2001; 50: 1006-1012.

Falnes PO, Wesche J, Olsnes S. Ability of the Tat basic domain and VP22 to mediate cell binding, but not membrane translocation of the diphtheria toxin A fragment. *Biochem*, 2001; 40: 4349-4358.

Farhat CK, Carvalho ES, Weckx LY. *Imunizações: fundamentos e prática*. São Paulo: editora Atheneu, 2000, p.19-25.

Fennelly GJ, Flynn JL, Ter MV, Liebert UG, Bloom BR. Recombinant bacilli Calmette-Guerin priming against measles. *J Infect Dis*, 1995; 172: 698-705.

Finberg RW, Wahl SM, Allen JB. Selective elimination of HIV-infected cells with an interleukin-2 receptor specific cytotoxin. *Science*, 1991; 252: 1703-1705.

Fine PEM, Carneiro IAM, Milstein JB, Clements CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. World Health Organization, WHO/V&B/99.23, 1999; p. 1-42.

Formiga LCD, Mattos-Guaraldi AL. Difteria – profissionais susceptíveis, diagnóstico, vacinação e reparação de danos, 2001; 37: 288-289.

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

Formiga LCD. Diagnóstico microbiológico da difteria. *Rev Bras Pat Clin* 1986; 22: 90-93.

Formiga LCD, Santos KRN, Rodrigues HA, Nogueira AS. Avaliação do teste de fluorescência em portadores cutâneos de *Corynebacterium diphtheriae*. *Rev Microbiol*, 1982; 13: 355-358.

Foss FM. Interleukin-2 fusion toxin: Targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma. *Ann Ny Acad Sci*, 2001; 941: 166-176.

Fraser DT, The technique of a method for the quantitative determination of diphtheria antitoxin by a skin test in rabbits. *Trans Roy Soc Can Section V*, 1931; 175-181.

Fuerst TR, De la Cruz VF, Bansai GP, Stover CK. Development and analysis of recombinant BCG vectors systems. *AIDS Res Hum Retrov*, 1992; 8: 1451-1455.

Fuerst TR, Stover CK, de la Cruz VF. Development of BCG as a live recombinant vector system: potencial use as in HIV vaccine. *Biotechnol Ther*, 1990 – 1991; 2 (2 – 1): 159 –178.

Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-Positive Rods. In *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, 2007; 9<sup>th</sup> edition: p. 485-514.

Funke G, Altwegg M, Frommelt L, Von Graevenitz A. Emergence of related nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype mitis strains in Western Europe. *Emerg Infect Dis*, 1999; 5: 477-80.

Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge III JE, Bernard KA. Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 1997; 10: 125-59.

Funke G, Lawson PA, Bernard KA, Collins MD. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *J Clin Microbiol*, 1996; 34(5): 1124-1128.

Gao XP, Liu ZM, Jiao YL. Diphtheria Toxin/Human B-Cell Activating Factor Fusion Protein Kills Human Acute Lymphoblastic Leukemia BALL-1 Cells: An Experimental Study. *Chin J Cancer Res*, 2012; 24: 238-244.

Gavigan JA, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. Use of conjugative and thermosensitive cloning vectors for transposon delivery to *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1995; 127(1-2): 35-39.

Galazka AM. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. *J Infect Dis*, 2000; 181: S2-S9.

Galazka AM. The immunological basis for immunization series. Module 2: Diphtheria. World Health Organization, WHO/EPI/GEN/93.12, 1993.

Gicquel B. BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals*, 1995; 23: 113-118.

Greenfield L, Bjorn MJ, Horn G. Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 6853-6857.

Golaz A, Lance-Parker S, Welty T, Schaefer L, Volmer L, Lafromboise C. Epidemiology of diphtheria in South Dakota. *South Dak J Med*, 2000; 53: 281-285.

Gomes DLR, Martins CAS, Faria LMD, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, Souza MC, Alves GB, Rosa ACP, Nagao PE, Pereira GA, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1419-1427.

Gor DO, Ding X, Li Q, Greenspan N S. Genetic fusion of three tandem copies of murine C3d sequences to diphtheria toxin fragment B elicits a decreased fragment B-specific antibody response. *Immunol Lett*, 2006; 102: 38-49.

Gotlieb SL, Gilleaudeae P, Johnson R. response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB 389 IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med*, 1995; 1: 442-447.

Govan VA, Williamson AL. Rabbits immunized with recombinant BCG expressing the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) L2E7E2 genes induces regression of established papillomas. *Virus Res*, 2007; 127: 43-48.

Govan VA, Christensen ND, Berkower C, Jacobs Jr WR, Williamson AL. Immunisation with recombinant BCG expressing the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) L1 gene provides protection from CRPV challenge. *Vaccine*, 2006; 24: 2087-2093.

Grindley NDF, Joyce CM. Genetic and DNA sequence analysis of the kanamycin resistance transposon Tn 903. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 7176-7180.

Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Eddine AN, Mann P, Goosmann C, Bandermann S, Smith D, Bancroft GJ, Reyrat JM, Soolingen DV, Raupach B, Kaufmann SHE. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*, 2005; 115: 2472-2479.

Grode L, Ganoza CA, Brohm C, Weiner J, Eisele B, Kaufmann SHE. Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine*, 2013; 31: 1340– 1348.

Groman, NB, Dean, CK. Toxinogenicity in *Corynebacterium diphtheriae* after loss catalase, cystinase, or deoxyribonuclease activity. *Infect Immun*, 1973; 8: 442-445.

Grüber C, Lau S, Dannemann A, Sommerfeld C, Wahn U, Aalberse C. Down regulation of IgE and IgG4 antibodies to tetanus toxoid and diphtheria toxoid by covaccination with cellular *Bordetella pertussis* vaccine. *J Immunol*, 2001; 16: 2411-2417.

Gubler J, Schneider-Huber C, Gruner E, Altwegg M. An outbreak of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: Single bacterial clone causing invasive infection among swiss drug users. *J Infect Dis*, 1998; 27: 1295-1298.

Gupta S, Bansal S, Deb JK, Kundu B. Interplay between DtxR and nitric oxide reductase activities: a functional genomics approach indicating involvement of homologous protein domains in bacterial pathogenesis. *Int J Exp Path*, 2007; 88: 377-385.

Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis*, 2000; 181(S1): S116-120.

Haeseler F, Pollet JF, Haumont M. Stable integration and expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein coding sequence in mycobacteria. *Mol Biochem Parasitol*, 1993; 57: 117-126.

Halioua B, Patey O, Casciani D, Emond JP, Dublanchet A, Malkin JE, Lafaix C. Diphtérie cutanée chez un patient infecté par le VIH. *Ann Dermatol Venerol*, 1992; 119: 874-877.



Handke K. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet*, 1981; 182: 288-292.

Hansmeier N, Chao TC, Kalinowski J, Pühler A, Tauch A. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics*, 2006; 6; 2465-2476.

Hayward CMM, O'Gaora P, Young DB, Griffin GE, Thole J, Hirst TR, Castello-Branco LRR, Lewis DJM. Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guerin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Vaccine*, 1999; 17: 1272-1281.

Heininger U, Sängler R, Jacquet J, Schuerman L. Booster immunization with a hexavalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus vaccine and *Haemophilus influenzae* type b conjugate combination vaccine in the second year of life: Safety, immunogenicity and persistence of antibody responses. *Vaccine*, 2007; 25: 1055-1063.

Hershberger CL, Rosteck PR Jr. Stability of recombinant plasmids for production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Bioproc Technol*, 1991; 13: 3-16.

Hirata R Jr, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DL, Damasco PV, Rosa AC, Nagao PE, Pimenta FP, Mattos-Guaraldi AL. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res*, 2008; 41: 986-991.

Hirata Jr R, Souza SM, Rocha SCM, Andrade AF, Monteiro-Leal LH, Formiga LC, Mattos-Guaraldi AL. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbiol Pathog*, 2004; 36: 125-130.

Hirata Jr R, Napoleão F, Monteiro-Leal LH, Andrade AFB, Nagao PE, Formiga LCD, Fonseca LS, Mattos-Guaraldi AL. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS. Microbiol Lett*, 2002; 215: 115-119.

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-KDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci*, 2000; 97: 13853-13858.

Huber-Schneider C, Gubler J, Knoblauch M. [Endocarditis due to *Corynebacterium diphtheriae* cause by contact with intravenous drugs: report of 5 cases]. *Schweiz Med Wochenschr*, 1994; 124: 2173-2180.

Husson RN, James BE, Young RA. Gene replacement and expression of foreign ADN in mycobacteria. *J Bacteriol*, 1990; 172: 519-524.

Jabbar IA, Fernando GJ, Sauders N, Aldovani A, Young R, Malcolm K. Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 e E7 proteins. *Vaccine*, 2000; 18: 2444-2453.

Jacobs WR Jr, Snapper SB, Lugosi L, Bloom BR. Development of BCG as a recombinant vaccine vehicle. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990; 155: 153-60.

Jacobs WR Jr, Tuckman M, Bloom BR. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid. *Nature*, 1987; 327: 532-535.

Jain R, Dey B, Dhar N, Rao V, Singh R, Gupta UD. Enhanced and enduring protection against tuberculosis by recombinant BCG-Ag85C and its association with modulation of cytokine profile in lung. *Plos One*, 2008; 3 (12): e 3869. 1-11.

Johnson VG, Nicholls PJ. Identification of a single amino acid substitution in the diphtheria toxin A chain of CRM 228 responsible for the loss of enzymatic activity. *J Bacteriol*, 1994; 4766-4769.

Johnson VG. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 832-834.

Kadirova R, Kartoglu HÜ, Strebel PM. Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, 1995. *J Infect Dis*, 2000; 181: S110-115.

Kameoka M, Nishino Y, Matsuo K, Ohara N, Kimura T, Yamazaki A, Yamada T, Ikuta K. Cytotoxic T lymphocyte response in mice induced by a recombinant BCG vaccination which produces an extracellular alpha antigen that fused with the human immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in the V3 loop. *Vaccine*, 1994; 12(2): 153-158.

Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S. Mycobacterium codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol*, 2005; 79: 8716-8723.

Kaufmann SHE. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. *J Intern Med*. 2010; 1-17.

Kaufmann SHE. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nature Rev*, 2006; 6: 699-704.

Kaufmann SHE, Hess J. Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol Lett*, 1999; 65: 81 -94.

Kawahara M, Matsuo K, Honda M. Intradermal oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. *Clin Immunol*, 2006; 119: 67-78.

Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M. Oral recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity. *Clin Immunol*, 2002; 105: 326-331.

Khan N, Shastri J, Argal U, Doctor B. Resurgence of diphtheria in the vaccination era. *Indian J Med Microbiol*, 2007; 25: 434.

Kieser T, Melton RE. Multi-copy positive selection plasmid vector for *Streptomyces*. *Gene*, 1988; 65: 83-91.

Kimura Y, Watanabe Y, Suga N, Suzuki N, Maeda K, Suzuki K, Kitagawa W, Miura N, Morita H, Imai H. Acute peritonitis due to *Corynebacterium ulcerans* in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis: a case report and literature review. *ClinExp Nephrol*, 2011; 15: 171–174.

Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*, 2005; 23: 2132-2135.

Kremer L, Dupré L, Riveau G, Capron A, Loch C. Systemic virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. *Clin Immunol*, 2006; 119: 67-78.

Kremer L, Dupré L, Riveau G, Capron A, Loch C. Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin expression glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. *Infect Immun*, 1998; 66: 5669-5676.

Kremer L, Riveau G, Baulard A, Capron A, Loch C. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant Bacillus Calmette- Guerin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *J Immunol*, 1996; 156: 4309-4317.

Kumaer PKR, Maschke HE, Friehs K, Schugerl K. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacterial in bioreactors. *Trends Biotechnol*, 1991; 9: 279-283.

Kumar D, Srivastava BS, Srivastava R. Genetic rearrangements leading to disruption of heterologous gene expression in mycobacteria: an observation with *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium smegmatis* and its implication in vaccine development. *Vaccine*, 1998; 16: 1212-1215.

- Labidi A, Mardis E, Roe BA, Wallace RJ. Cloning and DNA sequence of *Mycobacterium fortuitum* plasmid pAL 5000. *Plasmid*, 1992; 27: 130-140.
- Labidi A, David HL, Roulland-Dussoix D. Cloning and expression of mycobacterial plasmid DNA *Escherichia coli*. *Fems Microbiol Lett*, 1985; 30: 221-225.
- Ladokhin AS. pH-triggered conformational switching along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain. *Toxins (Basel)*, 2013; 5: 1362-1380.
- Lagranderie M, Murray A, Gicquel B. Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune response against the foreign antigen. *Vaccine*, 1993; 11: 1283-1290.
- Langermann S, Palaszynski SR, Burlein JE, Koenig S, Hanson MS, Briles DE, Stover K. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *Journal of Experimental Medicine*, 1994; 180: 2277-2286.
- Lazraq R, Calvel-Sérès S, David HL. Conjugative transfer of a shuttle of *Escherichia coli* to *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1990; 69: 135-138.
- Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR, Hatfull GF. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration: proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* and bacille Calmette-Guerin. *Proc Nat Acad Scien*, 1991; 88: 3111-3115.
- Lee JW, Nakamura LT, Chang MP, Wienieski, BJ. Mechanistic aspects of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *Bioch Bioph Acta*, 2005; 1747: 121-131.
- LeMaistre CF, Meneghetti C, Rosenblum M, Reuben J, Parker K, Shaw J, Deisseroth A, Woodworth T, Parkinson DR. Phase I trial of an interleukin 2 (IL-2) fusion toxin (DAB486IL-2) in hematological malignancies expressing the IL-2 receptor. *Blood*, 1992; 79: 2547-2554.
- Lessnick SL, Lyczak JB, Bruce C, Lewis DG, Kim PS, Stolowitz ML, Hood L, Wisnieski BJ. Localization of diphtheria toxin nuclease activity to fragment A. *J Bacteriol*, 1992; 174: 2032-2038.
- Lessnick SL, Bruce C, Baldwin RL, Chang MP, Nakamura LT, Wisnieski BJ. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 836-838.
- Leung NJ, Aldovani A, Young R, Jarvis MA, Smith JM, Meyer D. The kinetics of specific immune responses in rhesus monkeys inoculated with live recombinant BCG expressing SIV Gag, Pol, Env, and Nef proteins. *Virology*, 2000; 268: 94-103.
- Li WG, Wang H, Zhu YM. Changes of cytokines of splenocytes in mice immunized by mix recombinant BCG-EmII/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine of Em. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2007; 23: 911-913.

Liu W, O'Donnel MA, Chen X, Han R, Luo Y. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing interferon-alpha 2B enhances human mononuclear cell cytotoxicity against bladder cancer cell lines in vitro. *Cancer Immunol Immunother*, 2009; 58: 1647-1655.

Lortholary O, Buu-Hoi A, Gutmann L, Acar J. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis in France. *Clin Infect Dis*, 1993; 17: 1072-1074.

Lugosi L, Jacobs W Jr, Bloom BR. Genetic transformation of BCG. *Tubercle*, 1989; 70 (3): 159-70.

Luo Y, Yamada H, Chen X, Ryan AA, Evanoff DP, Triccas JA. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing mouse IL-18 augments Th1 immunity and macrophage cytotoxicity. *Clin Exp Immunol*, 2004; 137: 24-34.

Ma X, Lv P, Ye S. DT390-triTMTP1, a novel fusion protein of diphtheria toxin with tandem repeat TMTP1 peptide, preferentially targets metastatic tumors. *Mol Pharm*, 2013; 10: 115-126.

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

McCormick CM, Czachor JS. Pertussis infections and vaccinations in Bolivia, Brazil and Mexico from 1980 to 2009. *Travel Med Infect Dis*, 2013; 11: 146-151.

Mahajan D, Reid S, Cook J, Macartney K, Menzies RI. NSW annual report describing adverse events following immunisation, 2011. *N S W Public Health Bull*, 2012; 23: 187-200.

Mallucelli MIC, Carvalho JPP. Produção de vacina pertussis por diferentes processos. Níveis de proteção e aspectos econômicos. *Mem Inst Butantan*, 1983-1984; 81: 47-48.

Man P, Montagner C, Vitrac H, Kavan D, Pichard S, Gillet D, Forest E, Forge V. Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen-deuterium exchange measurements. *FEBS J*, 2010; 277: 653-662.

Marletta MA & Spiering MM Trace elements and nitric oxide function. *J Nutr*, 2003; 133: 1431S-1433S.

,

Martin-Serrano J, Folgueira L, Lera LT, Pedraza MA Lemichez E, Palomino SS, Noriega AR, Boquet P, Alcamí J. In vitro selective elimination of HIV infected cells from peripheral blood in AIDS patients by the immunotoxin DAB389CD4. *AIDS*, 1998; 12: 859-863.

Martins RM, Camacho LAB, Lemos C, Noronha T. Relatório do estudo de vigilância ativa de eventos adversos associados a vacina DTP/Hib utilizada no Programa Nacional de Imunizações 2005. Disponível em: <http://www.Infectologia.org.br/anexos/MS-PNI-Manual%20eventos%20adversos>. Acesso em: 7 de Novembro de 2006.

Mattos-Guaraldi AL, Damasco PV, Gomes DLR, Melendez MG, Santos SL, Marinelli RS, Napoleão F, Sabbadini PS, Santos CS, Moreira LO, Hirata Jr R. Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. *J Med Microbiol*, 2011; 60: 1685–1688.

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

Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Jr R. Diphtheria remains a threat to health in developing world - An overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003; 98: 987-993.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Camello TCF, Pereira GA, Hirata Jr R, Faria LMD, Halpern M. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev Arg Microbiol*, 2001; 33: 96-100.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr Microbiol*, 1998; 37: 156-158.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Braz J Med Biol Res*, 1991; 24: 399-406.

Matsumoto S, Yukitake H, Kanbara H, Yamada T. Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Secreting Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) Induces Protection against Rodent Malaria Parasite Infection Depending on MSP1-stimulated Interferon and Parasite-specific Antibodies. *J Exp Med*, 1998; 5: 845-851.

Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Totsuka M, Kobayashi K, Yukitake H, Yamada T. Establishment of a foreign antigen secretion system in micobactéria. *Infect Immun*, 1990; 58: 4049-4054.

Matsuo K, Yasutomi Y. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. *Tuberc Res Treat Art*, 2011; ID 574591, 2-9.

Maxwell IH, Maxwell F, Glode LM. Regulated expression of a diphtheria toxin A chain gene transfected into human cells: possible strategy for inducing cancer cell suicide. *Cancer Res*, 1986; 46: 4660-4664.

Mazzantini RP, Miyaji EN, Dias WO, Sakauchi D, Nascimento ALTO, Raw I, Winter N, Gicquel B, Rappuoli R, Leite LCC. Adjuvant activity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM<sub>197</sub> on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*, 2004; 22: 740-746.

Medeiros MA, Armôa GRG, McIntosh D, Delagostin AO. Differential humoral immune response induced in mice immunized with two strains of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin. *Canadian J Microbiol*, 2005; 51: 1-6.

Medeiros MA, Delagostin OA, Armôa GR, Degrave WM, De Mendonça-Lima L, Lopes MQ, Costa JF, Mcfadden J, McIntosh D. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. *Microbiol*, 2002; 148: 1999-2009.

Mederle I, Le Grand R, Vaslin B, Badell E, Vingert B, Dormont D. Mucosal administration of three recombinant *Mycobacterium bovis* BCG-SIVmac251 strains to cynomolgus macaques induces rectal IgAs and boosts systemic cellular immune responses that are primed by intradermal vaccination. *Vaccine*, 2003; 21: 4153-4166.

Messinova OV, Yusupova DV, Shamsutdinov NS. Desoxyribonuclease activity of *Corynebacterium* and its relation to virulence. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1963; 40: 20-23.

Mekada E, Okada Y, Uchida T. Identification of diphtheria toxin receptor and a non proteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. *J Cell Biol*, 1988; 107: 511-519.

Michelon A, Conceição FR, Binsfeld PC, da Cunha CW, Moreira AN, Argondizzo AP, McIntosh D, Armôa GRG, Campos AS, Farber M, McFadden J, Dellagostin OA. Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Anaplasma marginale* MSP1a antigen. *Vaccine*, 2006; 24: 6332-6339.

Milstien J. Desenvolvimento tecnológico de vacinas: projeções para 2015. Em *Vacinas, Soros e Imunizações no Brasil*, 2005. p. 147-190.

Mishra B, Dignan RJ, Hughes CF, Hendel N. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis – surgery for some but not all. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2005; 13: 119-126.

Miyaji EM, Mazzantini RP, Dias WO, Nascimento ALTO, Marcovistz R, Matos DS, Raw I, Winter N, Gicquel B, Rappuoli R, Leite LCC. Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM<sub>197</sub>, a mutant diphtheria toxin. *Infect Immun*, 2001; 69: 869-874.

Miyamura K, Nishio S, Ito A, Murata R, Kono R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres used VERO cells. I Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J Biol Stand*, 1974; 2: 189-201.

Moreira LO, Andrade AFB, Vale MD, Souza SM, Hirata Jr R, Asad LMOB, Asad NR, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Mattos-Guaraldi AL. Iron limitation effects on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae*. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69: 5907-5913.

Mortimer Jr EA & Wharton M. Diphtheria toxoid. *In: SA Plotkin, WA Orenstein Vaccines*, 2004; p. 509-520.

Moskaug JO, Stenmark H, Olsnes S. Insertion of diphtheria toxin B-fragment into the plasma membrane at low pH. Characterization and topology of inserted regions. *J Biol Chem*, 1991; 266: 2652-2659.

Mothershed EA, Cassiday PK, Pierson K, Mayer LW, Popovic T. Development of a Real-Time Fluorescence PCR Assay for Rapid Detection of the Diphtheria Toxin Gene. *J Clin Microbiol*, 2002; 40: 4713–4719.

Mulder MA, Zappe H, Steyn LM. Mycobacterial promotes. *Tuber Lung Dis*, 1997; 78: 211-223.

Murray A, Winter N, Langranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclere C, Moriarty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. Expression of Escherichia coli  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* with induced humoral and cellular immune response. *Mol Microbiol*, 1992; 6: 3331-3342.

Nakamura LT, Wisnieski BJ. Characterization of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *J Biol Chem*, 1990; 265: 5237-5241.

Nakao H, Pruckler JM, Mazurova IK, Narvskaia OV, Glushkevich T, Marijevski VF, Kravetz AN, Fields BS, Wachsmuth IK, Popovic T. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, tox, and its regulatory element, dtxR, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. *Transplantation*, 1996; 15; 61(11): 1629-1636.



Nascimento IP, Dias WO, Quintilio W, Christ AP, Moraes JF, Vancetto MD. Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against *Bordetella pertussis* intracerebral challenge. *Microb Infect*, 2008; 10: 198-202.

Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. *Infect Immun*, 2000; 68: 4877- 4883.

Nagel J, Svec D, Waters T, Fireman P. IgE synthesis in man. I. Development of specific IgE antibodies after immunization with tetanus-diphtheria (Td) toxoids. *J Immunol*, 1977; 118: 334-341.

Nilsson L, Grüber M, Granström M, Bjökstén B, Kjellman NI. Pertussis IgE and atopic disease. *Allergy*, 1998 ; 53: 1195-1201.

Nolan T, Hogg G, Darcy MA, Skeljo M, Carlin J, Bodlego J. A combined liquid Hib (PRP-OMPC), hepatitis B, diphtheria, tetanus and whole-cell pertussis vaccine: controlled studies of immunogenicity and reactogenicity. *Vaccine*, 2001; 19: 2127-2137.

Ohara N, Matsuoka M, Nomaguichi H, Naito M, Yamada T. Protective responses against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice induced by recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* over-producing three putative protective antigen candidates. *Vaccine*, 2001; 19: 1906-1910.

Orr N, Galen JE, Levine MM. Expression and Immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM<sub>197</sub>, and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908- *htr A*. *Infect Immun*, 1999; 67 (8): 4290-4294.

Papaevangelou G. Current combined vaccines with hepatitis B. *Vaccine*, 1998; 16: S69-72.

Parish T, Stoker NG. Electroporation of mycobacteria. *Mycobacteria protocols. Method in molecular biology*. New Jersey: Humana Press Totowa, 1998. p. 120–144.

Pappenheimer AM Jr. The story of a toxic protein, 1888-1992. *Prot Sci*, 1993; 2: 292-298.

Pappenheimer AM Jr. Diphtheria toxin. *Ann Rev Biochem*, 1977; 46: 69.

Pappenheimer AM Jr, Gill DM. Diphtheria. *Science*, 1973; 182: 353-358.

- Patey O, Bimet F, Riegel P, Halioua B, Emond JP, Estrangin E, Dellion S, Alonso JM, Kiredjian M, Dublanquet A, Lafaix C. Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 441-445.
- Peng W, Verbitsky A, Bao Y, Sawicki JA. Regulated expression of a diphtheria toxin in prostate cancer cells. *Mol Ther*, 2002; 6: 537-545.
- Pereira GA. Aspectos fenotípicos e genotípicos de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Brasil. Dissertação de mestrado grau de mestre em Microbiologia. Departamento de Bacteriologia - UERJ, Rio de Janeiro, 2001.
- Perkins S, Cordery R, Nixon G, Abrahams A, Andrews J, White J, Efstratiou A, Anaraki S. Investigations and control measures following a non-travel-associated case of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*, London, United Kingdom, December 2009-January 2010. *Euro Surveill*. 2010;15(16):pii=19544. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19544>. Acesso em: 26 de junho de 2011.
- Pimenta FP, Hirata R Jr, Rosa AC, Milagres LG, Mattos-Guaraldi AL. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *J Med Microbiol*, 2008; 57: 1438-1439.
- Pimenta FP, Matias GA, Pereira GA, Camello TC, Alves GB, Rosa AC, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. A PCR for dtxR gene: application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Cell Probes*, 2008; 22: 189-192.
- Pimenta FP, Damasco PV, Neto JC, Lopes GS, Hirata Jr R, Milagres LG, Matos-Guaraldi AL. Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006; 101: 459-462.
- Portal da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis. Gráficos de evolução de doenças (1980-2005). Disponível em: [http://www.saude.gov.br/vigilância\\_epidemiológica\\_de\\_doenças\\_transmissíveis](http://www.saude.gov.br/vigilância_epidemiológica_de_doenças_transmissíveis). Acesso em: 03 de fevereiro de 2009.
- Popovic T, Mazurova I, Efstratiou A, Vuopio-Varkila J, Reeves MW, De Zoysa A, Glushkevich T, Grimont P. Molecular epidemiology of diphtheria. *J Infect Dis*, 2000; 181: S168-177.
- Popovic T, Kombarova SY, Reeves MW, Nakao H, Mazurova IK, Wharton M, Wachsmuth IK, Wenger JD. Molecular epidemiology of diphtheria in Rússia, 1985-1994. *J Infect Dis*, 1996; 174: 1064-1072.

Popovic T, Wharton M, Wenger JD, McIntyre L, Wachsmuth IK. Are we ready for diphtheria? A report from the Diphtheria Diagnostic Workshop, Atlanta, 11 And 12 July 1994. *J Infect Dis*, 1995; 171: 765-767.

Promkhatkaew D, Pinyosukhee N, Thongdeejaroen W, Sutthent R, Sawanpanyalert P, Warachit P. Enhancement of cell-mediated immune response in mice by whole HIV-1 gag in *Mycobacterium bovis* BCG as a live vaccine candidate. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2009; 40: 113-122.

Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med*, 2003; 9: 533-539.

Qie YQ, Wang JL, Zhu BD, Xu Y, Wang QZ, Chen JZ. Evaluation of a new recombinant BCG which contains mycobacterial antigen ag85B-mpt64 (190-198)-mtb8.4 in C57-BL6 mice. *Scand J Immunol*, 2008; 67: 133-139.

Rao V, Dhar N, Tyagi AK. Modulation of host immune response by overexpression of immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in bacille Calmette-Guerin. *Scand J Immunol*, 2003; 58: 449-61.

Rakhmanova AG, Prigozhina VK, Nosikova EV, Kadirova SN, Stepanova EV, Taits BM. Fatal diphtheria outcomes in vaccinated adults. *Klin Med J (Mosk)*, 1996; 74: 67-69.

Rapeah S, Norazmi MN. Immunogenicity of a recombinant *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin expressing malarial and tuberculosis epitopes. *Vaccine*, 2006; 24: 3646-3653.

Raw I, Higashi HG, Mercadante AO. Desenvolvimento e produção de vacinas e soros no Instituto Butantan. Em *Vacinas, Soros e Imunizações no Brasil*. Editora Fiocruz, 2005; 1ª edição.

Reacher M, Ramsay M, White J, De Zoysa A, Efstratiou A, Mann G, Mackay A, George RC. Nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: An emerging pathogen in England and Wales. *Emerg Inf Dis*, 2000; 6: 640-645.

Rezende CAF, De Moraes MTB, Matos DCS, McIntosh D, Armôa GRG. Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens. *J Virol Methods*, 2005; 125: 1-9.

Riegel P. Les Corynébactéries, Aspects Bactériologiques et Cliniques. *Ann Biol Clin*, 1998; 56: 285-296.

Romaniuk SI, Kolibo DB, Komisarenko SV. Perspectives of application of recombinant diphtheria toxin derivatives. *Russ J Bioorg Chem*, 2012; 38: 639-652.

Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 1625-1629.

Rose NR, Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. American Society for Microbiology Press, DC, Washington, 2005; 5<sup>th</sup> edition.

Rossi R, Lichtner M, Iori F, Ermocida A, Mascia C, Mengoni F, Sauzullo I, Dini D, Mastroianni CM, Vullo V. Dendritic cells in blood and urine samples from bladder cancer patients undergoing BCG immunotherapy. *Arch Ital Urol Androl*, 2013; 31; 85(4): 157-163.

Rydell N, Stertman L, Stalenheim G, Sjöholm I. Use of an oral diphtheria vaccine in human. *Vaccine*, 2006; 24: 5928-5930.

Rydell N, Sjöholm I. Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. *Vaccine*, 2004; 22: 1265-1274.

Sadoh AE, Oladokun RE. Re-emergence of diphtheria and pertussis: implications for Nigeria. *Vaccine*, 2012; 30: 7221-7228.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 2<sup>nd</sup> edition.

Santangelo MP, McIntosh D, Bigi F, Armôa GR, Campos ASD, Ruybal P, Dellagostin OA, McFadden J, Mendum T, Gicquel B, Winter N, Farber M, Cataldi A. *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*. *Vaccine*, 2007; 25: 1104-1113.

Scarselli M, Giuliani MM, Adu-Bobie J, Pizza M, Rappuoli R. The impact of genomics on vaccine design. *Trends Biotech*, 2005; 23: 84-91.

Schiller J, Groman N, Coyle M. Plasmids in *Corynebacterium diphtheriae* mediating erythromycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983; 18: 814-821.

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

Schmitt MP, Holmes RK. Analysis of diphtheria toxin repressor-operator interactions and characterization of a mutant repressor with decreased binding activity for divalent metals. *Mol Microbiol*, 1993; 9: 173-181.

Schmitt MP, Holmes RK. Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains. *Infect Immun*, 1991; 59: 1899-1904.

Schuhegger R, Linder Mayer M, Kugler R. Detection of Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* Strains by a Novel Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, 2008; 46: 2822-2823.

Schuhegger R, Lindermayer M, Kugler R. Detection of Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* Strains by a Novel Real-Time PCR. J Clin Microbiol, 2008; 46: 2822–2823.

Seixas FK, Borsuk S, Fagundes MK, Hartwig DD, da Silva EF, Cerqueira M, Dellagostin AO. Stable expression of *Leptospira interrogans* antigens in auxotrophic *Mycobacterium bovis* BCG. Biol Res, 2010; 43: 13-18.

Seixas FK, Fernandes CH, Hartwig DD, Conceição FR, Aleixo JA, Dellagostin AO. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. Can J Microbiol, 2007; 53: 472-479.

Seixas FK, da Silva EF, Hartwig DD, Cerqueira GM, Amaral M, Fagundes MQ. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. Vaccine, 2007; 26: 88-95.

Serwold-Davis TM, Groman NB. Mapping and cloning of *Corynebacterium diphtheriae* plasmid pNG2 and characterization of its relatedness to plasmids from skin coryneforms. Antl Agents Chem, 1986; 30: 69-72.

Sevigny LM, Booth BJ, Rowley KJ. Identification of a Human Monoclonal Antibody to Replace Equine Diphtheria Anti-toxin for the Treatment of Diphtheria Intoxication. Infec Immun, 2013; 81(11): 3992-4000.

Sing A, Bierschenk S, Heesemann J. Classical diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans* in Germany: amino acid sequence differences between diphtheria toxins from *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. Clin Infec Dis, 2005; 40: 325–326.

Singh J, Harit AK, Jain DC, Panda RC, Tewari KN, Bhatia R. Diphtheria is declining but continues to kill many children: analysis of data from a sentinel center in Delhi, 1997. Epid Infec, 1999; 123: 209-215.

Singh S, Saraav I, Sharma S. Immunogenic potential of latency associated antigens against *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine, 2014; 32(6): 712-716.

Shi C, Wang X, Zhang H, Xu Z, Li Y, Yuan L. Immune responses and protective efficacy induced by 85B antigen and early secreted antigenic target-6 kDa antigen fusion protein secreted by recombinant bacilli Calmette-Guerin. Acta Bioch Bioph Sin, 2007; 39: 290-296.

Shively JM. Prokariote inclusions: Descriptions and Discoveries in Jessup M. Shively Ed. Inclusions in Prokariotes. Springer-Verlag Berlin. p: 3-20.

Smith WP, Tai PC, Murphy JR. Precursor in cotranslational secretion of diphtheria toxin. J Bacteriol, 1980; 141(1): 184-189.

Smith WP, Tai PC, Murphy JR. Precursor in cotranslational secretion of diphtheria toxin. *J Bacteriol*, 1980; 141(1): 184-189.

Snapper SB, Lugosi L, Jekkel A. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc Nat Acad Sci*, 1988; 85: 6987-6991.

Someya K, Cecilia D, Ami Y, Nakasone T, Matsuo K, Burda S. Vaccination of rhesus macaques with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin Env- V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. *J Virol*, 2005; 79: 1452-1462.

Snell JJS, Demello JV, Gardner OS, Wantes WK, Brooks R. Detection of toxin production by *Corynebacterium diphtheriae*: results of a trial organized as part of the united kingdom national external microbiological quality assessment scheme. *J Clin Path*, 1984; 37: 796-799.

Speranza FAB, Ishii SK, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL, Milagres LG. Diphtheria toxin IgG levels in military and civilian blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 2010; 43: 120-123.

Stover CK, Bansal GP, Hanson MS. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate lyme disease vaccine. *J Exp Med*, 1993; 178: 197-209.

Stover CK, De la Cruz VF, Fuerst TR. New use of BCG recombinant vaccines. *Nature*, 1991; 351: 456-460.

Streit JA, Recker TJ, Donelson JE, Wilson ME. BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasit*, 2000; 94: 33-41.

Summer DK. Stability of genetic material in prokaryotes. *Biologicals*, 1993; 21: 91-93.

Sugawara I, Sun L, Mizuno S, Taniyama T. Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009; 89: 62-67.

Sugawara I, Li Z, Sun L, Udagawa T, Taniyama T. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007; 87: 518-525.

Supply P, Sutton P, Coughlan SN. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*, 1999; 17: 705-714.

Sun R, Skeiki YA, Izzo A, Dheenadhayalan V, Iman Z, Penn E. Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens: pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, 2009; 27: 4412-4423.

Tacket CO, Kelly SM, Schödel F, Losonsky G, Nataro JP, Edelman R, Levine MM, CURTISS R. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect Immun*, 1997; 65(8): 3381-3385.

Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Waijalku W. Efficacy of recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine secreting interleukin-15 antigen 85B fusion protein in providing protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 2008; 197: 1263-1274.

Tao X, Zeng HY, Murphy JR. Transition metal ion activation of DNA binding by the diphtheria tox repressor requires the formation of stable homodimers. *Proc Nat Acad Sci*, 1995; 92: 6803-6807.

Tao X, Murphy JR. Binding of metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria tox operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from Dnase I Digestion. *J Biol Chem*, 1992; 267: 21761-21764.

Tao X, Boyd J, Murphy JR. Specific binding of the diphtheria tox regulatory element DtxR to the tox operator requires divalent heavy metal ions and a 9-base pair interrupted palindromic sequence. *Proc Nat Acad Sci*, 1992; 89: 5897-5901.

Tárraga AMC, Efstratiou A, Dover LG, Holden MTG. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129. *Nuc Acids Res*, 2003; 31: 6516-6523.

Tullius MV, Harth G, Maslesa-Galic S, DILLON BJ, HORWITZ MA. A replication limited recombinant *Mycobacterium Bovis* BCG vaccine against tuberculosis designed for human immunodeficiency virus positive person is safer and more efficacious than BCG. *Infect Immun*, 2008; 76: 5200-5214.

Uchida T, Yoneda M. Estimation of the time required for the process of diphtheria toxin formation. *Biken J*, 1967; 10: 121-128.

Upham JW, Rate A, Rowe J, Kusel M, Sly PD, Holt PG. Dendritic Cell immaturity during infancy restricts the capacity to express vaccine-specific T-cell memory. *Infect Immun*, 2006; 74: 1106-1112.

Uno-Furuta S, Matsuo K, Tamaki S, Takamura S, Kamei A, Kuromatsu I, Kaito M, Matsura Y, Miyamura T, Adachi Y, Yasutomi Y. Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine*, 2003; 21: 3149 -3156.

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infect Immun*, 2004; 72: 3336-3343.

Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, Miyaji EN, Torres FIG, Gebara VC, Armôa GRG, Campos AS, Matos DCS, Winter N, Gicquel B, Vilar MM, McFadden J, Almeida MS, Tendler M, McIntosh D. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine*, 2003; 21: 3149 -3156.

Varghese MJ, Ramakrishnan S, Kothari SS, Parashar A, Junuja R, Saxena A. Complete heart block due to diphtheritic myocarditis in the present era. *Ann Ped Card*, 2013; 6: 34-38.

Von Hunolstein C, Alfarone G, Scopetti F, Pataracchia M, La Valle R, Franchi F, Pacciani. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. *J Med Microbiol*, 2003; 52: 181-188.

Wada N, Ohara N, Kameoka M. Long lasting immune response induced by recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) secretion system. *Scand J Immunol*, 1996; 43: 202-209.

Wagner KS, White JM, Lucenko I. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. *Emerg Infect Dis*, 2012; 18: 217-225.

Wang CY, Li F, Yang Y, Guo Hy Wu Cx, Wang S. Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. *Canc Res*, 2006; 66: 5798-5806.

Wang H, Liu Q, Liu K, Zhong W, Gao S, Jiang L. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Internat*, 2007; 56: 263-268.

Wang J, London E. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. *Biochemistry*, 2009; 48: 10446-10456.

Wang JL, Qie YQ, Zhu BD, Zhang HM, Xu Y, Wang QZ. Evaluation of a recombinant BCG expressing antigen Ag85B and PPE protein Rv3425 from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis* in C57BL-6 mice. *Med Microbiol Immunol*, 2008; 198: 5-11.

Wang LM, Shi CH, Fan XL, Xue Y, Bai YL, Xu ZK. Expression and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin strains secreting the antigen ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *J Chi Med*, 2007; 120: 1220-1225.



Wang Q, Li J, Zhang X, Liu Q, Liu C, Ma G. Protective immunity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing rhomboid gene against *Eimeria tenella* challenge. *Veter Parasit*, 2009; 160: 198-203.

Weckx Ly, Divino-Goes K, Lihama DM, Carraro E, Bellei N, Granato CFH, de Moraes-Pinto MI. Effect of a single tetanus-diphtheria vaccine dose on the immunity of elderly people in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 2006; 39: 519-523.

Wei SH, Yin W, An QX, Lei YF, Hu Xb, Yang J. A novel hepatitis C virus vaccine approach using recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* expressing multi-epitope antigen. *Arch Virol*, 2008; 153: 1021-1029.

Wilson BA, Blanke SR, Murphy JR, Pappenheimer AM Jr, Collier RJ. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 1990; 250: 834-835.

Winter N, Lagranderie M, Gangloff S, LeClerc C, Gheorghiu M, Gicquel B. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine*, 1995; 13: 471-478.

Winter N, Lagranderie M, Rauzier J, Timm J, LeClerc C, Guy B. Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene*, 1991; 109: 47-54.

Wharton M, Vitek CR. Diphtheria toxoid. In S.A. Plotkin, WA Orenstein Vaccines W.B. Saunders Company, 2004; 4th edition.

White A, Ding X, Vanderspek JC, Murphy JR, Ringe D. Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. *Nature*, 1998; 394: 502-506.

Wolff C, Wattiez R, Ruyschaert JM, Cabiaux V. Characterization of diphtheria toxins catalytic domain interaction with lipid membranes. *Bioch Bioph Acta*, 2004; 1661: 166-177.

World Health Organization (WHO). Laboratory methods for the testing for potency of diphtheria (D), tetanus (T), pertussis (P) and combined. 26 January, 1993; p. 1-105.

World Health Organization (WHO). The immunological basis for immunization series - Module 2: Diphtheria - Update 2009. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597869\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597869_eng.pdf). Acesso em: 22 de janeiro de 2011.

Xu Y, Zhu B, Wang Q, Chen J, Qie Y Wang J. Recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and mouse-INF-gama confers effective protection against *Mycobacterium tuberculosis* in C57BL-6 mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007; 51: 480-487.

Yamada H, Matsumoto S, Matsumoto T, Yamada T, Yamashita U. Murine IL-2 secreting recombinant bacillus Calmette-Guerin augments macrophage mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J Urol*, 2000; 164: 526-531.

Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 1978; 15: 245-50.

Yasutomi Y, Koenig S, Haun SS. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in Rhesus monkeys. *J Immunol*, 1993; 150: 3101-3107.

Yu JS, Peacock JW, Jacobs Jr WR, Frothingham R, Letvin NL, Liao HX. Recombinant bacillus Calmette-Guerin elicits HIV-1 envelope-specific T lymphocytes at mucosal sites. *Clin Vacc Immunol*, 2007; 14: 886-893.

Zapardiel J, Nieto E, Gegúndez MI, Gadea I, Soriano F. Problems in minimum inhibitory concentration determinations in coryneform organisms. Comparison of an agar dilution and the E test. *Diag Microbiol Infect Dis*, 1994; 19(3): 171-173.

Zhang LJ, Waters CA, Poisson LR, Estis LF, Crumpacker CS. The interleukin 2 fusion protein, DAB389IL-2, inhibits the development of infectious virus in human immunodeficiency virus type 1 infected human peripheral blood monuclear cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997; 175: 790-794.

Zasada AA, Zaleska M, Podlasin RB, Seferynska I. The first case of septicemia due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: case report. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2005; 4: 1-4.

Zepp F, Knuf M, Heining U, Jahn K, Collard A, Habermehl P. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a combined hexavalent tetanus, diphtheria, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus vaccine and Haemophilus influenzae type B conjugate vaccine, for primary immunization of infants. *Vaccine*, 2004; 22: 2226-2233.

Zheng C, Xie P, Chen Y. Immune response induced by recombinant BCG expressing merozoite surface antigen 2 from *Plasmodium falciparum*. *Vaccine*, 2001; 20: 914-919.

Zheng C, Xie P, Chen Y. Recombinant *Mycobacterium Bovis* BCG producing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* FCC-1/HN strain induces strong immune responses in BAL/c mice. *Parasitology International*, 2002; 51: 1-7.

Zhu YD, Fennelly G, Miller C, Tarara R, Saxe I, Bloom B. Recombinant bacilli Calmette-Guerin expressing the measles virus nucleoprotein protects infant rhesus macaques from measles virus pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997; 176: 1445-1453.

**ANEXO A** - Experimentos envolvendo *C. diphtheriae*

## Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz) sob nº (P0163-03) e (L00034-07).

## **ANEXO B – Produção Científica Durante o Período de Realização do Doutorado**

### **Linha de Pesquisa**

#### **1. Pesquisa e desenvolvimento**

Desenvolvimento de vacinas recombinantes; Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*; Expressão de proteínas recombinantes em sistema procariótico e eucarioto;

#### **2. Desenvolvimento de vacinas vivas modificadas geneticamente para uso humano.**

Desenvolvimento de Insumos para Imunodiagnóstico;

#### **3. Membro de Equipe CNPq 2009. Estudo *in vitro* e *in vivo* de aspectos relacionados à virulência e clonalidade de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*.**

### **Artigos Completos Publicados em Periódicos**

1. NASCIMENTO, D. V.; LEMES, E. M. B.; J.L.S. Queiroz; J.G.Silva Jr.; NASCIMENTO, Hilton Jorge Do; SILVA, Edimilson Domingos da; R. Hirata Jr.; A.A.S.O. Dias; C.S. Santos; G.M.B. Preira; A.L. Mattos-Guaraldi; ARMÔA, Geraldo Rodrigues Garcia . Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the Park Williams 8 Corynebacterium diphtheriae strain toxin. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. , v. 43, p. 409-521, 2010.

2. NASCIMENTO, D. V.; DELLAGOSTIN, O.; R. Hirata Jr.; G.M.B. Preira ; A.L. Mattos-Guaraldi; ARMÔA, Geraldo Rodrigues Garcia. Plasmid instability when the *hsp60* gene promoter is used to express the protective non-toxic fragment B of the diphtheria toxin in recombinant BCG. American Journal of Molecular Biology, v. 3, p. 81-86, 2013.

3. Dilzamar V. Nascimento, Odir A. Dellagostin, Denise C. S. Matos, McIntosh D, Raphael Hirata Jr, Geraldo M. B. Pereira, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Geraldo R.G. Armôa. *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the dtb gene antigen from diphtheria toxin (**Fase Final de Redação para Submissão**).

### **Resumos Publicados em Anais de Congressos**

1. Gomes DLR ; NASCIMENTO, D. V. ; R. Hirata Jr. ; A.L. Mattos-Guaraldi ; Sabbadini PS . Correlação entre a forte habilidade de formação de biofilme e o desenvolvimento de endocardite por *C. diphtheriae* subspecie gravis. In: 26 **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2011, Foz do Iguaçu - Parana. Microbiologia em foco, 2011.

2. Nascimento, DV; Dellagostin, OA; Pereira, GMB; Mattos-Guaraldi, AL, Armôa, GRG. *Mycobacterium bovis* BCG as a stable recombinant prototype vaccine for induction of a humoral response against the B antigen of *C. diphtheria*. **XXI Alam Congresso Latino Americano de Microbiologia**, 2012, Santos, São Paulo.

3. Nascimento, DV; Dellagostin, OA; Pereira, GMB; Mattos-Guaraldi, AL, Armôa, GRG. Construction of a stable recombinant BCG vaccine prototype expressing the protective non-toxic fragment B of the diphtheria toxin. **58 Congresso Brasileiro de Genética**, 2012, Foz do Iguaçu – PR.

### **Apresentação de trabalho**

1. Conferencista no **I Simpósio de Microbiologia Médica Humana**. Resposta Imune a Infecções e Vacinas. 2010.

2. Palestrante no **Instituto Oswaldo Cruz/Imunologia**. Construção e avaliação de cepas de BCG recombinante para expressão do fragmento B da toxina diftérica. 2009.

### **Participações**

1. Membro da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (CIPA) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ - gestão 2009-2010.

### **Concurso Público**

1. Concurso para professora substituta do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) - Campus Realengo. Aprovada (20º lugar).