

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

Liliane Simpson Lourêdo

**ASPECTOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE MECANISMOS DE INTERAÇÃO
COM SUPERFÍCIES BIÓTICAS E ABIÓTICAS, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE
FOSFOLIPÁSICA DE *Corynebacterium ulcerans***

Rio de Janeiro

2019

Liliane Simpson Lourêdo

**ASPECTOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE MECANISMOS DE INTERAÇÃO
COM SUPERFÍCIES BIÓTICAS E ABIÓTICAS, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE
FOSFOLIPÁSICA DE *Corynebacterium ulcerans***

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Maria Helena S. Villas Bôas

Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Lourêdo, Liliâne Simpson

Aspectos fenotípicos e genotípicos de mecanismos de interação com superfícies bióticas e abióticas, citotoxicidade e atividade fosfolipásica de *Corynebacterium ulcerans*. / Liliâne Simpson Lourêdo. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

114 f. : il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas; Ana Luiza de Mattos Guaraldi.

1. *Corynebacterium ulcerans*. 2. Métodos de identificação. 3. Fatores de virulência. 4. Fosfolipase D. I. Título.

Phenotypic and genotypic aspects of interaction mechanisms with biotic and abiotic surfaces, cytotoxicity and phospholipase D activity of *Corynebacterium ulcerans*.

Liliane Simpson Lourêdo

ASPECTOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE MECANISMOS DE INTERAÇÃO
COM SUPERFÍCIES BIÓTICAS E ABIÓTICAS, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE
FOSFOLIPÁSICA DE *Corynebacterium ulcerans*

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Silvia Maria dos Reis Lopes (Doutora)
Instituto Oswaldo Cruz

Prescilla Emy Nagao Ferreira (Doutora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

ORIENTADORES

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Doutora) - Orientadora
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Aos meus saudosos e queridos pais,
Gladys e Newton; ao inesquecível
Professor Raphael Hirata Jr, sempre
presente com sua sabedoria e boa
vontade.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Prof^a Ana Guaraldi e Prof^a Maria Helena por seu profissionalismo e incentivo e que sempre se mostraram generosas com seus conselhos; e em particular por toda paciência e compreensão.

À banca por gentilmente aceitarem o convite e sempre contribuírem de forma positiva com seus conselhos e sugestões.

Ao Prof Raphael (*in memoriam*) e todo grupo do Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por todo o conhecimento dividido e ajuda inestimável.

Ao Prof. Andreas Burkovski e alunos do BurkLab da Friederich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, pela acolhida amigável e conhecimento partilhado, em especial Renata e Camila.

À Prof. Verônica Vieira e ao Dr. Alexandre Dias pelo suporte, dicas e auxílio nas diferentes fases do doutorado.

Aos amigos de caminhada científica: Juliana, Vanilda, Cecília, Bete, Mônica, Dryelle, Sabrina, Bia e outros mais novos que foram chegando e me ajudando em muitos momentos.

A CAPES, FAPERJ, CNPq, pelos anos de bolsas concedidas e apoio financeiro.

Às funcionárias da Coordenação de Pós-Graduação do INCQS-Fiocruz, aos técnicos e funcionários da FIOCRUZ e UERJ que de alguma forma colaboraram para a conclusão desta tese.

Ao meu irmão Leandro, que sempre teve uma palavra de apoio na hora em que eu precisava; à minha família, minha prima Irene, meus amigos, que entenderam minha ausência e torceram por mim, meu obrigada.

Aos animais que serviram de modelo biológico e que contribuíram para que a ciência fosse feita.

E a Deus, criador de todas as fantásticas formas de vida, por princípio de fé e reconhecimento.

*A única felicidade da vida está na consciência
de ter realizado algo útil em benefício da comunidade.*

Vital Brazil

RESUMO

Corynebacterium ulcerans têm sido cada vez mais responsáveis por quadros de difteria zoonótica, além de outras infecções de humanos e de animais de companhia, tanto por amostras produtoras ou não de toxina diftérica (TD). Além da TD, *C. ulcerans* produz fosfolipase D, exotoxina reconhecidamente seu principal fator de virulência e envolvida no estabelecimento de processos infecciosos. Estudos prévios indicaram em seu genoma a existência de genes codificadores para outros fatores de virulência. No Brasil, recentemente houve notificação de caso de difteria por *C. ulcerans* TD-negativa em co-infecção com mononucleose infecciosa. A amostra isolada do paciente (2590) foi analisada por vários métodos fenotípicos e, uma vez que não houve a confirmação de espécie, foram realizados métodos genotípicos de identificação. Apesar da amostra 2590 possuir o gene *pld*, não expressava PLD em teste fenotípico. Diante desse quadro, o presente estudo teve como objetivo avaliar aspectos fenotípicos e genotípicos de mecanismos de interação com superfícies bióticas e abióticas, citotoxicidade e atividade fosfolipásica de amostras de *C. ulcerans*, incluindo a 2590, nos processos que contribuem para a colonização e estabelecimento de infecção no hospedeiro. Os métodos de identificação API Coryne e MALDI TOF não foram capazes de identificar todas as amostras, porém testes genotípicos (mPCR e sequenciamento) foram conclusivos, assim como detecção dos genes *tox* e *pld*. O teste CAMP foi eficiente para observação da expressão da PLD. Ensaioes moleculares demonstraram a heterogeneidade do gene *pld* de *C. ulcerans* e sugeriram rearranjos no genoma bacteriano, porém a construção de mutantes para o gene *pld* não foi concluída. Independente da capacidade de produção de PLD, as amostras de *C. ulcerans* apresentaram resistência a penicilina e clindamicina. Da mesma forma, a expressão de PLD não interferiu na habilidade de se manterem viáveis em biofilme formado sobre superfícies abióticas e na capacidade de aderir, invadir e sobreviver no interior de macrófagos. De forma diversa, foi sugerido que a produção de PLD pelas amostras de *C. ulcerans* pode interferir na aderência e capacidade de invadir células HeLA, na afinidade de *C. ulcerans* ao fibrinogênio (Fbg), fibronectina (Fn) e colágeno tipo I de humanos e na sobrevivência de nematódeos *Caernohabditis elegans* e lagartas de *Galleria mellonella*. A expressão de PLD e TD igualmente interferiu em perfis hematológicos de murinos e na formação de lesões cutâneas, aumentada pela presença de TD. A concentração de ferro não interferiu na expressão de PLD avaliada pelo teste CAMP. Concluindo, amostras de *C. ulcerans* podem ser encontradas colonizando a população humana e animal em áreas rurais e urbanas e possuem potencial patogênico de natureza multifatorial.

Os dados sugerem que a expressão de PLD, embora importante, está interligada a outros fatores de virulência para o estabelecimento de processos infecciosos.

Palavras-chave: Difteria. *Corynebacterium ulcerans*. Zoonose. PLD. Potencial de Virulência.

ABSTRACT

Corynebacterium ulcerans have been increasingly isolated from zoonotic diphtheria, as well as other human and companion animal infections by diphtheria toxin (TD) and non-diphtheria-producing samples. In addition to TD, *C. ulcerans* produces phospholipase D, exotoxin known as its main virulence factor and involved in the establishment of infectious processes. Previous studies showed the occurrence of others putative virulence factors coding genes in *C. ulcerans* genome. In Brazil, a case of diphtheria by TD-negative *C. ulcerans* strain and infectious mononucleosis co-infection was recently reported. The clinical sample isolated (2590) was analyzed by several phenotypic methods and, since there was no species identification, genotypic methods were carried out. Although the 2590 sample possessed the *pld* gene, it did not express PLD in a phenotypic test. Therefore, the aim of this study was to evaluate the phenotypic and genotypic aspects of interaction mechanisms with biotic and abiotic surfaces, cytotoxicity and phospholipase activity of *C. ulcerans* samples, including 2590, in the colonization and establishment processes of infection in the host. API Coryne phenotyping system and the MALDI TOF method were not able to identify all the samples, but genotypic methods (mPCR and sequencing) were able to identify *Corynebacterium* species as well as the presence of the *tox* and *pld* genes. The CAMP test was efficient to observe PLD expression. Molecular assays demonstrated *C. ulcerans pld* gene heterogeneity and suggested rearrangements in the bacterial genome, but *pld* gene mutant construction was not performed. Independent of PLD production, *C. ulcerans* strains showed resistance to penicillin and clindamycin. Similarly, PLD expression also did not interfere with the ability to remain viable in biofilm formed on abiotic surfaces and on the ability to adhere, invade and survive within macrophages. Inversely, results suggested that PLD production by *C. ulcerans* strains can affect adherence and ability to invade HeLA cells, the affinity to human fibrinogen (Fbg), fibronectin (Fn) and type I collagen and in survival of *Caenorhabditis elegans* nematodes and *Galleria mellonella* larvae. PLD and TD expression had influence in murine hematological profiles and induced skin lesions in mice, but TD production enhanced effects. The iron concentration had no effects in PLD expression evaluated by CAMP test. In conclusion, *C. ulcerans* strains can be found in human and animal populations in rural and urban areas, showing pathogenic potential of multifactorial nature. The results suggest that although PLD expression is crucial, it must be interconnected with other virulence factors for establishment of infectious processes. Key words: Diphtheria. *Corynebacterium ulcerans*. Zoonosis. PLD. Virulence Potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Multiplex-PCR de amostras de <i>C. ulcerans</i> para identificação de genes das espécies potencialmente produtoras de toxina diftérica-TD e fosfolipase D-PLD (<i>pld</i> R2) 56
Figura 2	Resultados do teste de CAMP das amostras de <i>C. ulcerans</i> 59
Figura 3	Multiplex-PCR de amostras de <i>C. ulcerans</i> para detecção do gene <i>pld</i> com oligonucleotídeo <i>pld</i> R1 60
Quadro 1	Alinhamento de sequências dos genes <i>pld</i> de amostras de <i>C. ulcerans</i> 61
Figura 4	Árvore filogenética do gene <i>pld</i> de <i>C. ulcerans</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i> 62
Gráfico 1	Aderência das amostras de <i>C. ulcerans</i> ao colágeno Tipo I 63
Gráfico 2	Aderência das amostras de <i>C. ulcerans</i> ao fibrinogênio 63
Gráfico 3	Aderência das amostras de <i>C. ulcerans</i> à fibrinectina 64
Gráfico 4	Análise quantitativa de microrganismos viáveis no biofilme 65
Figura 5	CAMP reverso da amostra 2590 <i>pld</i> -mutante 66
Figura 6	Amostras com plasmídeo pEPR1p45gfp 66
Figura 7	Microscopia de fluorescência em amostras de <i>C. ulcerans</i> com plasmídeo pXMJ19mCherry 67
Gráfico 5	Sobrevivência de <i>C. elegans</i> pós-infecção com <i>C. ulcerans</i> 68
Figura 8	Imagem de infecção por <i>C. ulcerans</i> 2649 pXMJ19 mCherry em <i>C. elegans</i> 69
Figura 9	Imagem de infecção por <i>C. ulcerans</i> 2590 pXMJ19 mCherry em <i>C. elegans</i> 69
Figura 10	Imagem de infecção por <i>C. ulcerans</i> 809 pXMJ19mCherry em <i>C. elegans</i> 69
Figura 11	Rouleaux eritrocitário em <i>C. ulcerans</i> 210932 73
Figura 12	Neutrófilo tóxico 73
Figura 13	Agregação plaquetária..... 73
Figura 14	Lesão no local de inoculação de suspensão bacteriana em cauda de camundongo Swiss-Webster 74
Figura 15	Ausência de lesão no local de inoculação de suspensão bacteriana em cauda de camundongo Swiss-Webster 74

Figura 16	CAMP-reverso da amostra 809	75
Figura 17	CAMP-reverso da amostra 2590	75
Figura 18	CAMP-reverso das amostras BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 e 210932..	76
Gráfico 6	Aderência a macrófagos por amostras de <i>C. ulcerans</i>	77
Gráfico 7	Invasão de macrófagos por amostras de <i>C. ulcerans</i>	77
Gráfico 8	Aderência em células HeLa por amostras de <i>C. ulcerans</i>	78
Gráfico 9	Invasão em células HeLa por amostras de <i>C. ulcerans</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Infecções por <i>C. ulcerans</i> em humanos	23
Tabela 2	Origem e presença do gene <i>tox</i> codificador de toxina diftérica	35
Tabela 3	Iniciadores utilizados nos ensaios de *mPCR para identificação das espécies <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i> e detecção simultânea de toxina diftérica (TD); e nos ensaios de **PCR para o gene <i>pld</i> de <i>C. ulcerans</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i>	37
Tabela 4	Sequências oligonucleotídicas iniciadoras empregadas na construção de gene <i>pld</i> de cópia truncada	42
Tabela 5	Amostras de <i>C. ulcerans</i> em ensaio de infecção em camundongos	51
Tabela 6	Identificação de amostras de <i>C. ulcerans</i> pela técnica de MALDI-TOF MS.....	56
Tabela 7	Perfis de susceptibilidade de amostras de <i>C. ulcerans</i> de origens diversas a agentes antimicrobianos	58
Tabela 8	Sequências de oligonucleotídeos, enzimas de restrição e temperatura empregadas para construção de <i>C. ulcerans</i> 2590 <i>pld</i> _mutante	65
Tabela 9	Número de óbitos e melanização de lagartas de <i>G. mellonella</i> 7 dias pós-infecção*.....	71
Tabela 10	Contagem de células sanguíneas em hemograma de camundongos pós- infecção	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

TD	Toxina diftérica
OMS	Organização Mundial de Saúde
LC	Linfadenite caseosa
<i>rbp</i>	ribossomal-binding protein
n°	número
a	anos
F	feminino
M	masculino
ND	Não declarado
CAMP	<i>Christie Atkins Munch-Peterson</i> (fator CAMP)
<i>rRNA</i>	RNA ribossomal
<i>rpoB</i>	RNA polimerase subunidade B
PCR	Reação de polimerase em cadeia
mPCR	multiplex PCR
<i>pld</i>	Fosfolipase D
DNA	Ácido desoxiribonucleico
MALDI-TOF MS	<i>Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>
PLD	Fosfolipase D
<i>cpp</i>	<i>Corynebacterial protease CP40</i>
<i>tspA</i>	serina-protease tripsina similar
<i>nanH</i>	Neuraminidase H
<i>spa</i>	<i>Surface-anchored protein</i>
3 R	Redução, substituição e refinamento
ME	Micro-organismos emergentes
MRE	Micro-organismos re-emergentes
U-937	<i>Human myelomonocytic leukemia cells</i>
HeLa	Células de carcinoma de cérvix humanas (Henrietta Lacks)
LDCIC	Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

DNase	Desoxirribonuclease
DAU	Duplo açúcar-uréia
PYZ	Pirazinamidase
PYRA	Pirrolidonil-arilamidase
β -GAL	β -glucuronidase
α -GLU	α -glucosidase
NI	não identificado
+	presença
-	ausência
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
°C	Graus Celsius
h	Hora
g	unidade gravitacional
μ L	microlitros
Min	minutos
Seg	segundos
<i>dtxR</i>	<i>Diphtheria toxin repressor</i>
pb	pares de base
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
HCE	Hospital Central do Exército
MI	Mononucleose infecciosa
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
BHI	<i>brain-heart-infusion</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</i>
Fbg	Fibrinogênio
Fn	Fibronectina
Co1-I	Colágeno tipo I
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
PBS	tampão salina fosfato
M	molar
UFC	unidades formadoras de colônias

D.O.	densidade óptica
µg	microgramas
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
PBST	tampão salina fosfato –Tween
mL	mililitros
ECM	matriz extracelular
TMB	tetrametilbenzidina
HCl	Ácido clorídrico
nm	nanômetro
SD	Desvio padrão
<i>Tox+</i>	toxinogênica
<i>Tox-</i>	atoxinogênica
FAU	Universidade Friederich-Alexander
pmol	picomol
Ta	Temperatura de anelamento
N	nucleotídeos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
dNTP	deoxinucleotídeo
mM	millimolar
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
V	volts
UV	ultra-violeta
TE	Tris-EDTA
mg	miligrama
RNase	ribonuclease
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
U	unidade
OH	hidroxila
ng	nanograma
kb	kilobase
LB	Luria-Bertani
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
µg.mL ⁻¹	micrograma por mililitro

rpm	rotações por minuto
HI	<i>Heart infusion</i>
BHI-ZSS	BHI-glicina-sacarose
v/v	volume/volume
kV	quilovolt
Ω	ampere
μ F	microfarad
IPTG	isopropil-b-D-tiogalactopiranosida
NGM	nematode growth médium
NA	ácido nalidíxico
MgSO ₄	sulfato de magnésio
Kg	quilograma
UFC. mL ⁻¹	UFC por mililitro
EDTA K ₂	Ácido etilenodiaminotetracético dipotássico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
FeCl ₃	Cloreto férrico
PBS-D	<i>Dulbecco modified phosphorus buffer saline solution</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EUA	Estados Unidos da América
SFB	Soro fetal bovino
DMEM+	DMEM + SFB + gentamicina
MOI	multiplicidade de infecção
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
PAL	fosfatase alcalina
β -NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
β -GLU	β -glucosidase
TD+	TD positiva
TD-	TD negative
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
U/mL	Unidades por mililitro
UI	Unidades internacionais
S	sensível

I	intermediária
R	resistente
DAR	deformidade da região anal
TGI	trato gastro-intestinal
LG	Leucometria global
Hm	Hemácias
Seg	Segmentado
Linfo	Linfócito
Mono	Monócito
Baso	Basófilo
Eosino	Eosinófilo
PLD+	PLD positiva
PLD-	PLD negativa
DAT	Toxina anti-diftérica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos da difteria	20
1.2 Potencial zoonótico das corinebactérias potencialmente produtoras de TD	21
1.3 Caracterização fenotípica, genotípica e do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de <i>C. ulcerans</i>	25
1.4 Patogenicidade e fatores de virulência	26
1.5 Justificativa e relevância	29
2 OBJETIVO GERAL	32
2.1 Objetivos específicos	32
3 METODOLOGIA	34
3.1 Origem e identificação das amostras de <i>C. ulcerans</i> por métodos fenotípicos convencionais e semi-automatizado	34
3.2 Identificação das amostras de <i>C. ulcerans</i> por técnicas molecular e fenotípica	36
3.2.1 Identificação pela técnica Multiplex-PCR (mPCR).....	36
3.2.2 MALDI-TOF MS.....	37
3.3 Descrição do primeiro caso de difteria zoonótica associado a mononucleose infecciosa	38
3.4 Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos	38
3.5 Pesquisa de atividade fosfolipásica através de métodos fenotípicos e genotípicos	39
3.6 Sequenciamento do genoma da amostra pld-negativa 2590	39
3.7 Análise filogenética do gene <i>pld</i>	40
3.8 Avaliação da capacidade de interação bacteriana com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular de origem humana	40
3.9 Análise quantitativa da capacidade de interação bacteriana com superfície abiótica	41
3.10 Ensaios moleculares relacionados à construção de mutante com cópia truncada para o gene <i>pld</i>	41
3.10.1 Análises em bioinformática	41
3.10.2 Análise dos produtos amplificados	43
3.10.2.1 <i>Extração do DNA bacteriano</i>	43

3.10.2.2	<i>Obtenção do fragmento para interromper o gene pld</i>	44
3.10.2.3	<i>Restrição do fragmento de DNA</i>	44
3.10.2.4	<i>Desfosforilação da extremidade 5' do vetor pK18mob e ligação dos fragmentos de DNA</i>	45
3.10.2.5	<i>Produção de E. coli DH5αMCR quimiocompetente</i>	45
3.10.2.6	<i>Transformação em E. coli DH5αMCR e BL-21 quimiocompetentes</i>	46
3.10.2.7	<i>Extração do DNA plasmidial amplificado em E. coli DH5αMCR e LB-21</i>	46
3.10.2.8	<i>Produção de C. ulcerans eletrocompetente</i>	47
3.10.2.9	<i>Transformação em C. ulcerans</i>	47
3.11	Clonagem das amostras de C. ulcerans com plasmídeos pxmj19mcherry e pepr1p45gfp	48
3.11.1	<i>Seleção dos clones positivos para o plasmídeo pXMJ19mcherry</i>	48
3.11.2	<i>Seleção dos clones positivos para o plasmídeo pEPR1p45gfp</i>	49
3.12	Análise através de modelo experimental <i>in vivo</i> da influência de PLD na mortalidade e alterações morfológicas de nematódeos C. elegans	49
3.13	Avaliação do potencial de virulência das amostras empregando modelo experimental <i>in vivo</i> em lagartas de G. mellonella	50
3.14	Avaliação do perfil hematológico e indução de lesão cutânea de murinos pós-infectados com C. ulcerans	50
3.15	Influência de concentrações de ferro na expressão de fosfolipase D	51
3.16	Pesquisa da capacidade de interação bacteriana com macrófagos humanos e células HeLa	52
3.16.1	<i>Interação bacteriana com macrófagos U-937</i>	52
3.16.2	<i>Interação com células HeLa</i>	53
3.17	Considerações éticas	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Origem e identificação das amostras de C. ulcerans por métodos fenotípicos convencionais e semi-automatizado	55
4.2	Identificação das amostras de C. ulcerans por técnicas moleculares	55
4.2.1	<i>Identificação pela técnica de mPCR</i>	55
4.2.2	<i>Identificação pela técnica de MALDI-TOF MS</i>	56
4.3	Descrição do primeiro caso de difteria zoonótica associado a mononucleose infecciosa	57
4.4	Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos	57

4.5 Pesquisa de atividade fosfolipásica através de métodos genotípicos e fenotípicos	59
4.6 Sequenciamento do genoma da amostra PLD-negativa 2590	60
4.7 Análise filogenética e heterogeneidade do gene <i>pld</i>	60
4.8 Avaliação da capacidade de interação bacteriana com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular de origem humana	62
4.9 Análise quantitativa da capacidade de interação bacteriana com superfície abiótica	64
4.10 Ensaio molecular relacionado à construção de mutante com cópia truncada para o gene <i>pld</i>	65
4.10.1 Análises em bioinformática.....	65
4.11 Clonagem das amostras de <i>C. ulcerans</i> com plasmídeos <i>pxmj19mcherry</i> e <i>pepr1p45gfp</i>	66
4.12 Análise através de modelo experimental <i>in vivo</i> da influência de PLD na mortalidade e alterações morfológicas de nematódeos <i>C. elegans</i>	67
4.13 Avaliação do potencial de virulência pelo modelo experimental <i>in vivo</i> em lagartas de <i>G. mellonella</i>	70
4.14 Avaliação do perfil hematológico e indução de lesão cutânea de murinos pré e pós-infectados com <i>C. ulcerans</i>	71
4.15 Influência de concentrações de ferro na expressão de fosfolipase D	74
4.16 Pesquisa da capacidade de interação bacteriana com macrófagos humanos e células HeLa	76
4.16.1 Interação bacteriana com macrófagos U-937.....	76
4.16.2 Interação com células HeLa	77
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A TESE DE DOUTORADO	101
APÊNDICE B – TRABALHO APRESENTADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A TESE DE DOUTORADO	112
APÊNDICE C – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS PUBLICADOS	113
APÊNDICE D - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS EM REVISÃO	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos da difteria

A difteria é uma doença infectocontagiosa imunoprevenível, de evolução aguda com manifestações locais e sistêmicas que pode acometer crianças e adultos. Em sua forma clássica, há formação de pseudomembrana acinzentada no sítio de infecção como sinal patognomônico, em decorrência dos efeitos da liberação de toxina diftérica (TD) e da resposta do hospedeiro. No início, o maior número de casos e óbitos era observado em crianças de até 4 anos de idade que não haviam sido imunizadas com toxóide diftérico (HADFIELD *et al.*, 2000; MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; AZEVEDO, 2014). Atualmente a doença permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade, em criança e adultos, nos diferentes continentes, apesar da implantação de programas de imunização infantil na maioria dos países (GALAZKA, 2000; BITRAGUNTA *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2007; WANG; LONDON, 2009; MAN *et al.*, 2010; SAIKYA *et al.*, 2010; MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; AZEVEDO, 2014).

Nos anos 80 acreditava-se que a difteria seria erradicada da Europa até 2000, tão baixo era o número de casos; porém, nos anos 90, uma epidemia assolou os países da antiga União Soviética, alguns países da Europa Ocidental e Ásia. A Organização Mundial de Saúde (OMS) determinou a instauração de uma equipe para controlar a maior epidemia nos últimos tempos, através da vigilância de casos, diagnóstico e atendimento rápido (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011). A espécie *Corynebacterium diphtheriae*, quando produtora de TD, encontra-se principalmente associada a quadros de difteria clássica. Entretanto, cepas atoxinogênicas podem ser capazes de causar outros quadros de infecções localizadas ou sistêmicas em humanos, incluindo pneumonia, bacteremia, osteomielite, abscesso esplênico, endocardite e infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos, notadamente em países tropicais, onde a difteria ainda ocorre de forma endêmica. Nas três últimas décadas houve aumento de infecções invasivas devido a amostras atoxinogênicas. (MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011; MAY; MCDOUGALL; ROBSON, 2014). Adicionalmente, amostras atoxinogênicas podem albergar o gene *tox* codificador de TD em seu genoma, e potencialmente reverterem à forma produtora de toxina, o que as torna uma ameaça à saúde humana (SEKAR *et al.*, 2017).

No Brasil, em 2010, um surto de difteria foi relatado no Maranhão (n=27), por amostras atoxinogênicas e toxinogênicas, com 26 casos em crianças, total ou parcialmente imunizadas; três pacientes vieram a óbito (SANTOS *et al.*, 2015a). Além disso a Venezuela, país de fronteira

territorial com o Brasil, vem registrando um grande número de casos de difteria e é necessária uma vigilância epidemiológica atenta (OMS, 2018).

1.2 Potencial zoonótico das corinebactérias potencialmente produtoras de TD

Embora tenha sido originalmente considerado um patógeno humano, nas últimas décadas *C. diphtheriae* tem sido isolado de animais, incluindo lesões de úbere de vaca, lesão cutânea em cavalo e otite em gato doméstico, o que alertou a comunidade científica para o potencial zoonótico desse patógeno (CORBOZ *et al.*, 1996; HIRATA JR *et al.*, 2008; HALL *et al.*, 2010; LEGGET, 2010).

Além de *C. diphtheriae*, as espécies *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, podem carrear o gene *tox* e provocar processos infecciosos tanto em humanos como em animais (SETO *et al.*, 2008; TIWARI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2010; MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; AZEVEDO, 2014; HACKER *et al.*, 2016a).

Desde a última epidemia de difteria ocorrida nos países do Leste Europeu, iniciada na década de 90, tem sido observado um número crescente de casos de difteria causados por *C. ulcerans*, principalmente em países desenvolvidos. Entretanto, poucos relatos sobre infecções humanas por *C. pseudotuberculosis* são encontrados na literatura disponível, existindo o relato de dez casos na Austrália, em trabalhadores de fazenda de criação de ovinos, e quatro casos na Europa (PEEL *et al.*, 1997; PAVAN *et al.*, 2011). *C. pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), doença que acomete rebanhos de caprinos e ovinos; sua prevalência é alta em várias regiões do mundo, incluindo a América do Sul. No Brasil ela é endêmica, podendo atingir 70% do rebanho ovino/caprino, e uma vez que a erradicação da doença no rebanho é difícil devido à resposta ineficaz ao tratamento com antimicrobianos, recomendando-se a excisão cirúrgica dos abscessos e dos linfonodos afetados, a LC gera perdas econômicas consideráveis (DORELLA *et al.*, 2006; PAVAN *et al.*, 2011).

Conforme descrito na literatura, desde o ano de 1970, casos de infecções em humanos causados por *C. ulcerans* foram relatados em diversos países, acometendo adultos e crianças, em sua maioria do sexo feminino e idade superior a 50 anos. Inicialmente, o gado leiteiro era considerado o principal reservatório de *C. ulcerans*, e os consumidores de leite *in natura* e trabalhadores do meio rural formavam o grupo de risco. Atualmente, diversas infecções humanas causadas por *C. ulcerans* tiveram como possíveis fontes do patógeno outras espécies de animais domésticos, como cães, gatos e suínos e portanto, este patógeno apresenta potencial

zoonótico (DE ZOYSA *et al.*, 1995; TIWARI *et al.*, 2008; BONMARIN *et al.*, 2009; KATSUKAWA *et al.*, 2009; SCHUHEGGER *et al.*, 2009; SYKES *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2011a; SANGAL *et al.*, 2014; MEINEL *et al.*, 2015; HACKER *et al.*, 2016a). Na **Tabela 1** estão descritos vários casos de difteria zoonótica e/ou de outros quadros infecciosos causados por amostras atoxinogênicas e toxinogênicas de *C. ulcerans* desde 1990.

No Brasil, em 2008, foi descrito um caso de pneumonia fatal em paciente residente em área urbana de alto padrão socioeconômico no Rio de Janeiro (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008). Nesta oportunidade, embora não tenha sido detectada a presença do gene *tox* na amostra clínica (809), foi descrita pela primeira vez a presença do gene *rbp* codificador de uma toxina Shiga-like que ocasiona possíveis efeitos sistêmicos similares aos da TD. Posteriormente, na área metropolitana da mesma cidade foram identificados cães portadores de *C. ulcerans*: amostras BR-AD22 (em animal de abrigo), BR-AD41 e BR-AD61 (em animais domiciliados) (DIAS *et al.*, 2010; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014).

Os fatores que vêm favorecendo o surgimento de casos de infecções por *C. ulcerans* em homens e animais permanecem incompreendidos, embora seja possível que os fatores de virulência estejam se expressando em decorrência da pressão seletiva associada a condições socioeconômicas, como maior densidade demográfica e condições higiênico-sanitárias deficientes, aliadas ao convívio íntimo com animais de companhia (PESAVENTO, 2007). No Brasil, em vista das mudanças ocorridas na epidemiologia da difteria, o Ministério da Saúde emitiu uma Nota Técnica (Nº 25.000.140.269/2010-39), alertando sobre a situação da doença no país e sobre a possibilidade de difteria zoonótica, assim como estabelecimento de medidas de notificação, controle e tratamento da difteria.

Tabela 1 - Infecções por *Corynebacterium ulcerans* em humanos (continua)

País/ano	Nº casos	Idade /sexo	Quadro clínico	Gene <i>Tox</i>	Observações
Inglaterra/2000	03	F	Difteria clássica	+	Área rural
Japão/2001	01	Adulto/52a/F	Faringite	+	
Alemanha/ 2002	01	Adulto/77a/M	Sinusite necrótica	+	Área rural Óbito de vaca com descarga nasal
Suíça/2002	01	Adulto/ 71a/F	Difteria clássica	+	-
Holanda/2003	01	Adulto/58a/F	Difteria clássica	+	-
Itália/2003	01	Adulto/75a/F	Difteria clássica	+	-
Canadá/ 1999-2003	03	Adulto/>60 ^a	Lesões cutânea e/ou portador de cateter renal	+	-
França/2005	01	Adulto/47a/F	Difteria clássica	+	Cão com lesão labial crônica positiva para <i>C. ulcerans</i>
Japão/2005	03	Adulto/>50 ^a M, F, F	Parotidite/ Infecção pulmonar/ Difteria clássica	+	-
Inglaterra/2006	01/f	Adulto/idoso/F	Tonsilite	+	Cães (02) positivos
França/2006	01	Adulto/72a/F	Difteria clássica	+	Cão positivo
Japão/2007	01	Adulto/55a/M	Infecção pulmonar	+	-
Inglaterra/2007	01	Adulto/50a/M	Laringite	+	-
Brasil/2008	01	Adulto/80a/F	Pneumonia e lesão cutânea	-	-
USA/2008	01	Adulto/77a,66a/ M, F	Difteria-like	+	Área rural
USA/2008	01	Adulto/77a/M	Difteria clássica	+	Área rural
Alemanha/2009	01	Adulto/56a/F	Difteria clássica	+	Suíno como fonte de infecção

Fonte: Adaptado de Dias et al, 2011^a.

Tabela 1- Infecções por *C. ulcerans* em humanos (conclusão)

País/ano	Nº casos	Idade /sexo	Quadro clínico	Gene <i>Tox</i>	Observações
Inglaterra/2009	01	Adulto/idoso/F	Difteria	+	Área rural/ Cães (02) positivos
Inglaterra/2010	01	Adulto/20a/M	Tonsilite	+	
Japão/2010	02	Adulto/>50a/M, F	Faringite/Peritonite	+/-	
Alemanha/2012	01	Adulto/53a/F	Fascite necrosante	+	Cães (2) positivos
Bélgica/2012	01	Adulto/72a/M	Lesão cutânea crônica	+	Contato com gatos
Japão/2013	01	Adulto/M	Abscesso em linfonodo axilar		Gato como fonte de infecção
Alemanha/2014	02	Criança/13a/F Adulto/81a/F	Faringite Assintomático	+	Possível transmissão homem-homem
Escócia/2014	01	Adulto/>50a/F	Difteria clássica	+	
França/2014	01	Adulto/80a/F	Celulite	+	Contato com gatos (2) positivos
Brasil/2014	01	Jovem/15a/M	Faringite	-	
Itália/2014	01	Adulto/70a/F	Difteria clássica	+	Cão (1) positivo
Inglaterra/2015	01	Adulto/67a/F	Úlcera cutânea/edema em membro superior	+	Contato com cães, gatos e raposa
Dinamarca/2015	01	Adulto/61a/F	Infecção de ferida	-	Cão (1) positivo/ Área rural
França/2016	01	Adulto/83a/F	Lavado bronquial	-	
Inglaterra/2017	01	Adulto/63a/F	Difteria clássica	+	Cão (1) positivo
Japão/2017	01	Adulto/66a/F	Difteria clássica	+	Cão (1) positivo
Alemanha/2017	03	Adultos/nd	Infecção em pele e tecidos moles em membro inferior	+	Cães e gatos
Japão/2018	02	Adulto/67a/F Adulto/66a/F	Pneumonia com pseudomembrana	+	Gatos (3)
Itália/2018	02	Recém-natos	Oftalmia neonatal	-	

A, anos de idade; F, feminino; M, masculino; ND, não determinado; +, presença; -, ausência.

Fonte: Adaptado de Dias et al, 2011^a.

1.3 Caracterização fenotípica, genotípica e do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de *C. ulcerans*

Embora Inglaterra, França e outros países da Europa relatem regularmente o isolamento de *C. ulcerans*, incluindo amostras toxinogênicas, é improvável que somente nessas regiões esse patógeno seja encontrado. Lamentavelmente, uma grande proporção de profissionais da área da saúde encontra-se atualmente despreparada para reconhecer e identificar as infecções em humanos causadas por *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* em suas formas toxinogênicas e atoxinogênicas, inclusive no Brasil. A habilidade em detectar a presença de *C. ulcerans* é um potencial indicador de uma vigilância em saúde eficiente. Além do Reino Unido, poucos países mantêm uma rotina laboratorial estabelecida, com notificação obrigatória. Esse fato ressalta a necessidade da utilização de métodos de identificação precisos e rápidos na presença desses patógenos (DIAS *et al.*, 2011a; MATTOS GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011). A emergência de crescentes relatos de infecções respiratórias, cutâneas e invasivas pelas espécies de corinebactérias relacionadas a *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* tornam o diagnóstico e tratamento complexos (SEKAR *et al.*, 2017).

As corinebactérias são coradas pelo Gram e mostram bacilos suavemente curvados com extremidades arredondadas, conferindo um aspecto de clava e com arranjo típico em “letra chinesa”. Meio de cultura contendo telurito de potássio inibe o crescimento de outras bactérias não-corineformes e pode ser usado como um meio seletivo para isolar as espécies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, gerando colônias negras. Testes bioquímicos são utilizados na identificação de corinebactérias como: catalase, motilidade, redução de nitrato e hidrólise de ureia e de esculina, fermentação de açúcares e teste de CAMP (Christie; Atkins e Munch-Peterson). O sistema semi-automatizado API Coryne, que contém painéis de identificação em seu banco de dados, pode identificar corretamente 90,5% das amostras (KONRAD *et al.*, 2010). O sequenciamento dos genes *16S rRNA* e *rpoB* é indicado para a diferenciação entre essas espécies, desde que elas apresentem mais de 3% de divergência (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004; FUNKE; BERNARD, 2009; SEKAR *et al.*, 2017). Ensaio de PCR-multiplex (mPCR) para a concomitante identificação e detecção da toxinogenicidade (genes *tox* e *pld*) das amostras de *C. ulcerans* foram descritos por Torres *et al.* (2013).

A estrutura e composição do genoma são determinadas por vários eventos genéticos tais como duplicação, perda, transferência horizontal e reorganização dos genes. Inativação ou perda de genes é particularmente observada em vários gêneros bacterianos cujo meio de vida

está ligado a hospedeiros que proporcionam muitos intermediários metabólicos, o que determina a necessidade de se adaptar para manter a biossíntese dos genes, conseqüentemente muitos dos fatores de virulência estão envolvidos, em geral, a adaptações a nichos ecológicos. (VENTURA *et al.*, 2007; TAUCH, BURKOVSKI, 2015). Dessa forma, o desenvolvimento de sequenciamento de DNA de alto rendimento proporcionou oportunidades para a pesquisa de genomas bacterianos e suas particularidades, tais como: identificação de espécies bacterianas, assim como se mostrou uma ferramenta poderosa para o estudo de evolução microbiana, patogenicidade e seus determinantes genéticos (VENTURA *et al.*, 2007, HACKER *et al.*, 2016a).

A técnica de *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (ionização/dessorção de matriz assistida por laser-espectrometria de massa, MALDI-TOF MS) vem sendo utilizada com maior frequência na triagem laboratorial para identificação de espécies bacterianas, incluindo as do gênero *Corynebacterium*, com bons resultados, trazendo rapidez, menor manipulação da amostra a um custo efetivo mais baixo. A técnica promove a identificação das espécies baseada na composição proteica das células microbianas (KONRAD *et al.*, 2010; ALIBI *et al.*, 2015).

A penicilina-G e a eritromicina são as drogas de escolha de tratamento da difteria e conseqüentemente para prevenir a produção e propagação da TD em pacientes sintomáticos, assim como evitar o surgimento da doença clínica, pela disseminação a partir de um portador assintomático ou de contatos estreitos com colonizados. Entretanto, resistência à penicilina G, à oxacilina, à eritromicina, à rifampicina, à tetraciclina e à clindamicina têm sido relatadas (VON HUNOLSTEIN *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2011a; MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011). *C. ulcerans*, da mesma forma que *C. diphtheriae*, apresenta sensibilidade para eritromicina, azitromicina, claritromicina e penicilina, drogas de escolha no tratamento quando ocorrem infecções em que é o agente causador (WAGNER *et al.*, 2010). Entretanto, amostras resistentes à penicilina e à clindamicina já foram descritas (KATSUKAWA *et al.*, 2012; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014).

1.4 Patogenicidade e fatores de virulência

A TD é o fator de virulência mais bem estudado do gênero e é codificada pelo gene *tox* que está presente em bacteriófagos capazes de infectar *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*. Composta por dois fragmentos, A e B, tem tropismo por miocárdio, sistema nervoso, rins e suprarrenais, sendo capaz de promover rearranjo do citoesqueleto e

inibição da síntese proteica, provocando lise celular e fragmentação do DNA nuclear, levando a processos de apoptose e necrose celular (WONG; GROMAN, 1984; HADFIELD, 2000, SANTOS *et al.*, 2010). Entretanto, diferenças entre as sequências de nucleotídeos do gene *tox* foram encontradas em estudo realizado em amostras de *C. diphtheriae* (NAKAO *et al.*, 1996; ZAKIKHANY; NEAL; EFSTRATIOU, 2014); de maneira semelhante, o alinhamento de genes *tox* de *C. ulcerans* permitiu identificar falhas nas sequências que flanqueiam o gene *tox* comparadas com outras corinebactérias, sugerindo diferenças entre as TD codificadas (MEINEL *et al.*, 2014; DOMINGOS *et al.*, 2015).

Para uma colonização bem-sucedida de um hospedeiro, as bactérias patogênicas são equipadas com uma infinidade de proteínas e outros componentes, muitas vezes designados como fatores de virulência (TAUCH; BURKOVSKI, 2015). As espécies *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* possuem em seus genomas genes homólogos que codificam outros fatores de virulência além da TD, como a exotoxina fosfolipase D (PLD - principal fator de virulência dessas espécies) codificada pelo gene *pld*, uma esfingomielinase que possui atividade pró-inflamatória, aumentando a permeabilidade vascular e facilitando a disseminação do agente infeccioso no hospedeiro (MCNAMARA; CUEVAS; SONGER, 1995; TROST *et al.*, 2011; TAUCH; BURKOVSKI, 2015); somada à sua ação pró-inflamatória, possui atividade dermonecrótica e em altas doses é letal para espécies de laboratório e domésticas. Algumas de suas atividades biológicas são encontradas de forma semelhante em esfingomielinases presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (DORELLA *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2011b).

Estudos recentes demonstraram a habilidade de *C. ulcerans* interagir com fibrinogênio, fibronectina e colágeno (SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014) e de causar artrite através de disseminação hematogênica em camundongos, com alterações histopatológicas nas articulações como edema, infiltrado inflamatório e lesão do tecido ósseo (DIAS *et al.*, 2011b).

Outros possíveis fatores de virulência de *C. ulcerans* incluem aqueles codificados pelos genes: (i) *cyp* (*Corynebacterial* protease CP40), que possui forte similaridade ao domínio alfa da endoglicosidase E de *Enterococcus fecalis*, com atividade glucosaminidase, promovendo a degradação de ribonuclease e a inibição da biossíntese de proteínas, de maneira semelhante à TD, mimetizando os sinais sistêmicos da difteria; (ii) *rbp*, que codifica a proteína de ligação do ribossoma, com similaridade à toxina Shiga-like de *Escherichia coli*; (iii) *tspA*, serina-protease tripsina similar, (iv) *nanH*, neuraminidase; (v) *spaBCDEF*, que codificam subunidades de pilina (TROST *et al.*, 2011; TAUCH; BURKOVSKI, 2015, HACKER *et al.*, 2016a).

Para *C. diphtheriae*, as propriedades adesivas já vêm sendo estudadas e aspectos como a produção de biofilme, propriedades hidrofóbicas e hemaglutinantes (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 1999; SABBADINI *et al.*, 2012), presença de adesinas de natureza fimbrial (MANDLIK *et al.*, 2008; BRODWAY *et al.*, 2013) e não-fimbrial (SABBADINI *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015; SANGAL *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2017) e a capacidade de interação com proteínas de matriz extracelular (EMC) (ANTUNES *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2017) e fibrinogênio plasmático (SABBADINI *et al.*, 2010) parecem contribuir no processo de colonização, persistência e disseminação das infecções nos tecidos do hospedeiro. *C. diphtheriae* também foi capaz de produzir biofilme em diversas superfícies sólidas inertes, inclusive cateteres (MANDLIK *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2009). A produção de biofilme favoreceu a sobrevivência do patógeno na presença dos agentes antimicrobianos penicilina e eritromicina (GOMES *et al.*, 2013). A habilidade de *C. diphtheriae* interagir e de migrar através das barreiras epiteliais e endoteliais também já foi observada (HIRATA JR *et al.*, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2014). A adesina não-fimbrial DIP0733 (67-72p) contribuiu para a invasão e indução de apoptose em células epiteliais (HIRATA JR *et al.*, 2008; SABBADINI *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015). Amostras de *C. diphtheriae*, independente da produção de TD, exibiram estratégias de sobrevivência no interior de macrófagos humanos (linhagem U-937) e de indução de morte celular por apoptose e necrose (SANTOS *et al.*, 2010).

Para *C. ulcerans* as propriedades de adesão e invasão em células epiteliais e macrófagos foram igualmente comprovadas (HACKER *et al.*, 2015; HACKER *et al.*, 2016b). Adicionalmente, a habilidade de *C. ulcerans* para formação de biofilme foi observada, porém em grau menor que *C. diphtheriae* (SIMPSON-LOUREDO, 2014). Entretanto, a influência da PLD em interação com esses fatores é pouco estudada. Ensaio moleculares vêm sendo empregados para pesquisa da atividade e provável influência de genes e seus produtos em fatores de virulência de espécies bacterianas (LUCAS *et al.*, 2010; GREEN; SAMBROOK, 2012). A construção de mutantes de genes com cópia truncada foi utilizada em ensaios com *C. diphtheriae*, influenciando negativamente no processo de adesão e invasão de células epiteliais (ANTUNES *et al.*, 2015). No entanto, ensaios realizados com mutante para o gene CULC_0069 em *C. ulcerans*, homólogo ao DIP0733 de *C. diphtheriae* (HACKER *et al.*, 2015) não indicaram efeitos na adesão e invasão em células epiteliais.

Outra abordagem que vem sendo realizada é o uso de organismos simples como modelos biológicos em experimentos realizados no laboratório, já que esse procedimento possibilita a substituição do uso de organismos complexos (vertebrados). Essa conduta está de acordo com o “Princípio dos 3 R” (redução, substituição e refinamento), onde devem ser considerados

métodos alternativos para o uso de animais em experimentação (BRASIL, 2013a). Assim, os nematódeos da espécie *Caernohabditis elegans* vêm sendo utilizados em pesquisas por sua alta reprodutibilidade em um tempo curto (3dias), baixo custo e manutenção simples. Esses nematódeos possuem seu genoma todo codificado e existe disponível uma ampla variedade de mutantes para estudo sobre resposta do hospedeiro relacionada a fatores de virulência de patógenos. Alguns estudos de virulência envolvendo corinebactérias já têm empregado esse modelo (OTT *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015b). Outro modelo biológico de invertebrado que vem sendo utilizado em ensaios de virulência são as larvas da espécie de lepidóptero *Galleria mellonella* (traça do favo de mel ou traça da cera), que possuem uma resposta imune mais complexa e uma outra rota de infecção, uma vez que são infectados através de injeção pela sua cutícula (JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; OTT *et al.*, 2012).

A atividade fosfolipásica de aranha do gênero *Loxosceles* atua sobre eritrócitos de diferentes espécies em graus variáveis (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009). Para *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* os ensaios sobre atividade de PLD em células sanguíneas são escassos em literatura. Ensaio prévios utilizaram PLD purificada e a suspensão bacteriana em caprinos e camundongos, e foi observada influência da PLD nos diferentes perfis hematológicos (MAHMOOD *et al.*, 2015; MOCHIZUKI *et al.*, 2016). Uma vez que camundongos são resistentes a TD, o uso deste modelo elimina o efeito citotóxico da toxina interferente na análise dos estágios de infecção (MOCHIZUKI *et al.*, 2016).

1.5 Justificativa e relevância

As saúdes humana e animal sempre estiveram interligadas. No entanto, os processos sociais e agropecuários ocorridos nos últimos anos proporcionaram um contato maior entre a população humana e os animais domésticos. Esse contato facilitou a disseminação de agentes infecciosos para novos hospedeiros e ambientes, implicando em doenças emergentes de interesse nacional e/ou internacional (BRASIL, 2010).

A Vigilância Sanitária (VISA) abrange ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos e agravos à saúde do indivíduo e da coletividade, além de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, produção e circulação de bens da produção ao consumo e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde. Sua finalidade é promover e proteger a saúde e prevenir a doença por meio de estratégias e ações de educação e fiscalização (BRASIL, 1990).

Um aspecto inovador para as ações atuais de VISA é a utilização do princípio da precaução. Muitas vezes o risco pode ser avaliado como possibilidade, sem que haja, de fato, dados quantitativos, mas sim indícios, baseados na racionalidade e nos conhecimentos científicos disponíveis (BRASIL, 2007). A aplicação do princípio da precaução em seu conceito mais amplo, abrangendo o próprio ser humano, permite invocá-lo em casos de ameaça à saúde humana (CEZAR; ABRANTES, 2003). Segundo Dallari e Ventura (2002), aplicá-lo em ações de VISA é exigência de um comportamento prudente, no que tange a riscos sanitários.

Sob esta ótica, é necessário avaliar com cautela todos os possíveis casos de zoonoses emergentes, uma vez que podem se tornar um grande agravo para a saúde humana, devido à morbidade e à mortalidade apresentadas por determinadas doenças, principalmente em situações onde não se verifica um número de casos significativos. O estudo epidemiológico e o aprimoramento dos sistemas de vigilância das doenças são de extrema importância para se conhecer, intervir e recomendar ações que visem seu controle; para tanto é necessário conhecer os diferentes componentes da cadeia de transmissão, assim como os seus fatores de risco (BRASIL, 2010). A OMS estabelece como umas das três medidas no controle da difteria a prevenção de mortes e complicações pelo diagnóstico precoce e manejo apropriado dos casos (OMS, 2014).

Dados apresentados anteriormente enfatizam a negligência na pesquisa de micro-organismos emergentes (ME) ou re-emergentes (MRE) no Brasil. Os ME permanecem desconsiderados na cadeia de identificação pela falta de conhecimento dos profissionais já que, geralmente, são pouco associados à alta morbidade/mortalidade em humanos no mundo ou mesmo no Brasil. Os MRE podem, além disso, ter perfis de virulência alterados, com “ferramentas” que possibilitem a colonização e a invasão. Não podemos esquecer que todas essas modificações podem estar associadas à vacinação frente à principal espécie do grupo, primeiramente envolvida em causar doença, deslocando o perfil de espécies causadoras de doença, além dos casos incidentes sobre os indivíduos imuno-incompetentes ou aqueles que não possuem cobertura vacinal adequada (adultos) (MATTOS-GUARALDI; HIRATA J; DAMASCO, 2011; SOARES *et al.*, 2011).

Neste sentido, *C. ulcerans* vem se tornando uma preocupação no âmbito da Saúde Pública pelo potencial zoonótico. O número crescente de casos de *C. ulcerans* em cães e gatos ocorridos nos últimos cinco anos, realça sua importância como zoonose emergente, trazendo essa ameaça dos meios rurais para os centros urbanos. A emergência de infecção humana por *C. ulcerans* em áreas urbanas brasileiras foi recentemente documentada (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2011a; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014). Em agosto

de 2010, o Ministério da Saúde emitiu uma nota técnica (25000.140.269/2010-39) alertando sobre a situação da difteria no Brasil, enfatizando a mudança na faixa etária, ausência de pseudomembranas e a possibilidade da difteria zoonótica e a circulação de *C. ulcerans* e de *C. diphtheriae* no meio da população humana e animal.

Considerando as inúmeras variáveis envolvidas no processo de infecção por corinebactérias, a antibiotipagem deve ser sempre associada a, no mínimo, mais uma técnica de tipagem fenotípica e/ou genotípica. Os métodos moleculares associados aos métodos fenotípicos clássicos favoreceram os estudos da caracterização de micro-organismos para fins taxonômicos, diagnósticos e epidemiológicos.

Uma vez que a vacina protege apenas contra a ação de TD, os programas de imunizações não impedem a circulação de cepas endêmicas e epidêmicas de *C. diphtheriae*, tampouco de *C. ulcerans*. Portanto, a comunidade envolvida nos sistemas de vigilância deve permanecer atenta para as modificações na epidemiologia da doença e na virulência dos patógenos, inclusive na ocorrência de mutações naturais nas regiões que codificam as subunidades A e B da TD, ou mesmo na possibilidade de produção de tipos diferentes de toxinas como ocorre para as amostras de *C. ulcerans*, que além de fosfolipase D (PLD), podem produzir toxinas com homologia com TD ou com a toxina *Shiga-like*. Neste sentido, análises genômicas e proteômicas das espécies de corinebactérias potencialmente produtoras de TD (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*) têm sido objeto de estudo.

Além disso, diferenças quanto à capacidade de colonização e infecção das diversas corinebactérias podem ser relacionadas à prevalência de cepas epidêmicas, invasoras e/ou de alguns biótipos sobre os demais (MATTOS-GUARALDI; HIRATA J; DAMASCO, 2011, HACKER *et al.*, 2015). A identificação de mecanismos de interação deste micro-organismo poderá, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento das infecções causadas por esta espécie. Ligantes expressos na superfície de corinebactérias podem representar alvos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, vacinas ou bloqueadores de aderência e/ou invasão (SABBADINI *et al.*, 2010; ANTUNES *et al.*, 2015).

2 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral a identificação e a análise de mecanismos de interação de *C. ulcerans*, espécie com potencial zoonótico, com superfícies abióticas e bióticas e determinação do seu potencial de virulência por meio da exotoxina fosfolipase D (PLD). Neste sentido, amostras selvagens isoladas de humanos e de animais, além de amostras mutantes de *C. ulcerans* possuindo cópia truncada para o gene *pld*, foram submetidas a vários ensaios experimentais.

2.1 Objetivos específicos

- Identificação das amostras e por meio de testes fenotípicos convencionais, sistema semi-automatizado API-Coryne System V3.0 e técnicas molecular e fenotípica: mPCR e MALDI-TOF MS;
- Avaliação da capacidade de produção de toxina diftérica (TD) por técnica genotípica (mPCR);
- Descrição do primeiro caso de difteria zoonótica associado à mononucleose infecciosa;
- Análise do perfil de susceptibilidade a diversos agentes antimicrobianos;
- Pesquisa de atividade fosfolipásica através de métodos fenotípicos (teste de CAMP) e genotípicos (PCR utilizando oligonucleotídeos específicos do gene *pld* de *C. ulcerans*);
- Sequenciamento do genoma da amostra PLD-negativa 2590 isolada de humano;
- Análise filogenética do gene *pld* de amostras produtoras de PLD das espécies *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*;
- Avaliação da capacidade de interação bacteriana com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular de humanos (fibrinogênio, fibronectina e colágeno do tipo I);
- Análise quantitativa da capacidade de produção de biofilme em superfície abiótica;
- Ensaios moleculares relacionados à construção de mutantes com cópias truncadas do gene *pld*;
- Clonagem de amostras com inserção de plasmídeos pXMJ19*mCherry* e pEPR1p45*gfp* para aplicação em ensaios de fluorescência na interação bactéria-hospedeiro;

- Análise através de modelo experimental *in vivo* da influência de PLD na mortalidade e alterações morfológicas do nematódeo *Caenorhabditis elegans*;
- Avaliação do potencial de virulência das amostras empregando modelo experimental *in vivo* em lagartas de *Galleria mellonella*;
- Avaliação do perfil hematológico e indução de lesão cutânea de murinos pós-infectados com *C. ulcerans*;
- Influência de concentrações de ferro na expressão de PLD;
- Pesquisa da capacidade de interação bacteriana com células humanas e de linhagem contínua: macrófagos U-937 e células epiteliais (HeLa).

3 METODOLOGIA

3.1 Origem e identificação das amostras de *C. ulcerans* por métodos fenotípicos convencionais e semi-automatizado

Aspectos gerais de oito amostras de *C. ulcerans* parcialmente estudadas (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2010; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014) e estocadas a -70 °C em meio *skim milk* glicerol 15% no Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica (LDCIC) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM/UERJ) estão apresentados na **Tabela 2**. Este estudo foi parcialmente realizado durante um período de seis meses no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Friederich-Alexander Erlangen-Nuremberg, Alemanha, sob a coordenação do Prof. Dr. Andreas Burkovski.

As amostras foram submetidas aos testes bioquímicos convencionais conforme previamente descrito por Efstratiou e George (1999), Pimenta *et al* (2008) e Dias *et al* (2010), incluindo coloração de Gram, teste da catalase, desoxirribonuclease (DNAse), hidrólise da esculina, redução de nitrato, duplo-açúcar-ureia (DAU), gelatinase, pirazinamidase (PYZ), pirrolidonil-arilamidase (PYRA), β -galactosidase (β -GAL), N-acetil- β -glucosaminidase (β -NAG), fluorescência no teste King B, tirosina e fermentação de açúcares (maltose, sacarose, frutose, galactose, manitol, xilose, glicose, manose e ribose). Adicionalmente, foram testadas as atividades de fosfatase alcalina (PAL), β -glucuronidase (β -GLU), α -glucosidase (α -GLU) e glicogênio. O sistema semi-automatizado API-Coryne System V3.0™ foi realizado, conforme instruções do fabricante e analisado no sistema www.apiweb.biomerieux.com.

Tabela 2 - Origem e presença do gene *tox* codificador de toxina diftérica de oito amostras de *C. ulcerans* avaliadas no estudo

Número da Amostra/País	Origem/ Sítio de Isolamento	Gene <i>tox</i>	Referência
2590/Brasil, PE	Humana/ Faringite	-	Simpson-Lourêdo et al, 2019
809/2000/Brasil, RJ	Humana/ Pneumonia	-	Mattos-Guaraldi et al, 2008
210932/França	Humana/ NI	+	Viana et al, 2014
BR-AD41/Brasil, RJ	Canina/ Lesão cutânea	-	Simpson-Lourêdo et al, 2014
BR-AD61/Brasil, RJ	Canina/ Nasofaringe	-	Simpson-Lourêdo et al, 2014
2649/Brasil, PE	Canina/ Nasofaringe	-	Dados da presente tese
BR-AD22/Brasil, RJ	Canina/ Nasofaringe	-	Dias et al, 2010
BR-AD22 ELHA- <i>pld</i> mutante	Canina/ Nasofaringe	-	Ott et al, 2012

NI: não identificado; +: presença; -: ausência.

Fonte: Da autora, 2015

3.2 Identificação das amostras de *C. ulcerans* por técnicas molecular e fenotípica

3.2.1 Identificação pela técnica Multiplex-PCR (mPCR)

Foram realizados ensaios de mPCR para a identificação e concomitante detecção dos genes *tox* e *pld* das amostras de *C. ulcerans* empregadas nesse estudo.

Todas as amostras foram inoculadas em tubos contendo *Trypticase soy agar* (TSA) e incubadas a 37 °C por 24 h. Alíquotas das culturas foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 3.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspenso em 500 µl de água mili-Q estéril e submetido a banho-maria fervente (100 °C) por 15 min. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20 °C (BAIO et al, 2013). Em seguida, a suspensão foi centrifugada e 2 µl do sobrenadante, contendo DNA, foram empregados na mPCR (PIMENTA *et al.*, 2008). O programa de amplificação realizado em termociclador constitui-se em uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min; anelamento à temperatura de 55 °C por 40 seg e extensão à temperatura de 72 °C pelo intervalo de 1,5 min. A extensão final utilizou a temperatura de 72 °C por 5 min (TORRES *et al.*, 2013).

O protocolo da mPCR utilizou cinco pares de iniciadores: *16S RNA* (*C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*), *pld R2* (específico para *C. pseudotuberculosis*), *dtxR* (*C. diphtheriae*), *diphT 4* (gene *tox*) e *rpoB* (específico para *Corynebacterium* spp) (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados nos ensaios de *mPCR para identificação das espécies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* e detecção simultânea de toxina diftérica (TD); e nos ensaios de **PCR para o gene *pld* de *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*.

Iniciadores	Pares de base (pb)	Identificação e/ou função na PCR
<i>rpoB</i>		
C2700F:CGTATGAACATCGGCCAGGT C3130R:TCCATTTGCGCCGAAGCGCTG	446 pb	Identificação do gênero <i>Corynebacterium</i> spp.
<i>16S rRNA</i>		
<i>16S-F</i> : ACCGCACTTTAGTGTGTGTG <i>16S-R</i> : TCTCTACGCCGATCTTGTAT	816 pb	Espécies <i>C. ulcerans</i> e/ou <i>C. pseudotuberculosis</i>
<i>dtxR</i>		
<i>dtxR 1F</i> : GGGACTACAACGCAACAAGAA <i>dtxR 1R</i> : CAACGGTTTGGCTAACTGTA	258 pb	Espécie <i>C. diphtheriae</i>
<i>diphth 4</i>		
<i>Diphth 4F</i> : GAACAGGCGAAAGCGTTAAGC <i>Diphth 4R</i> : TGCCGTTTGATGAAATTCTTC	303 pb	Gene <i>tox</i> (fragmentos A e B da toxina diftérica)
<i>pld R2</i>		
<i>pld F</i> : ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA <i>pld R-2</i> : ATCAGCGGTGATTGTCTTCC	203pb	Gene <i>pld</i> (fosfolipase D – PLD) de <i>C. pseudotuberculosis</i>
<i>pld **</i>		
<i>pld F</i> :ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA <i>pld R-1</i> : ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG	203pb	Gene <i>pld</i> de <i>C. ulcerans</i>

Fontes: (*TORRES *et al.*, 2013; **PACHECO *et al.*, 2007).

3.2.2 MALDI-TOF MS

A técnica de MALDI-TOF MS foi realizada segundo Alibi *et al.* (2015). As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Central do Exército (HCE) e submetidas em aparelho Bruker Daltonik MALDI Biotyper (ionização/dessorção).

Valores de log resultante (score) acima de 2,0 foram considerados para identificação a nível de espécie; valores entre 1,7 e 2,0 foram considerados para identificação a nível de gênero e abaixo de 1,7 foram considerados sem identificação possível (KONRAD *et al.*, 2010).

3.3 Descrição do primeiro caso de difteria zoonótica associado a mononucleose infecciosa

Paciente, sexo masculino, idade 15 anos, sem histórico anterior de doença, residente em Pernambuco, foi atendido em ambulatório público com queixa de dor de garganta e febre há dez dias. O diagnóstico inicial foi faringite e o paciente tratado empiricamente com penicilina G benzatina. Após dois dias não houve melhora significativa e o paciente retornou ao hospital, onde a penicilina foi substituída por amoxicilina, que se mostrou igualmente ineficaz no tratamento da faringite e 24 h mais tarde, os sinais clínicos incluíam a presença de membrana branco-acinzentada estendendo-se da língua até faringe, área retrofaríngeana, disfagia, linfadenomegalia, com edema na região do pescoço (pescoço de touro) e sinais sistêmicos, sugestivos de difteria respiratória clássica. Consequentemente, o paciente foi admitido à unidade pediátrica de cuidados intensivos do hospital de referência em difteria e a terapia com azitromicina foi iniciada. Exames laboratoriais complementares, para difteria e mononucleose infecciosa (MI) foram igualmente realizados. Cardiomiopatia não foi detectada pelo exame físico. Devido à melhoria das condições clínicas e os resultados do hemograma e da bioquímica sérica se apresentarem normais, o paciente foi liberado após um dia. Após duas semanas, o paciente retornou para segunda avaliação clínica, sendo notada a presença de lesões em lábio inferior e região mentoniana. O material exsudativo coletado da faringe e analisado pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN)-Pernambuco mostrou resultados negativos para *C. diphtheriae*, mas não para *C. ulcerans*. Consequentemente, o isolado bacteriano foi encaminhado ao laboratório de difteria – LDCIC/UERJ, Rio de Janeiro, para identificação bacteriológica definitiva, tendo sido analisado pelos métodos acima descritos e encaminhado para posterior sequenciamento. A amostra de *C. ulcerans* isolada do paciente foi nomeada 2590.

A amostra 2649 foi isolada de animal (cão) na mesma localidade, porém não pertencente ao paciente com difteria e sem contato aparente que o identificasse como fonte primária da infecção.

3.4 Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (penicilina G, ampicilina, cefotaxime, imipenem, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, linezolida e vancomicina) foi avaliada pelo método de disco-difusão, em placas de ágar Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro, de acordo com os critérios preconizados pelo

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para outros micro-organismos que não sejam *Haemophilus* sp. e *Neisseria gonorrhoeae*, utilizando para os halos de penicilina G e ampicilina diâmetros estabelecidos para *Staphylococcus aureus*, conforme previamente adotado por outros autores (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; ORTEGA; SUAREZ, 1995; DIAS *et al.*, 2010; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014; CLSI, 2019). Além do método supracitado, a sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelos pontos de corte do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST- BrCAST, 2017), utilizando os halos de leitura para *Corynebacterium* spp.

3.5 Pesquisa de atividade fosfolipásica através de métodos fenotípicos e genotípicos

As amostras foram testadas fenotipicamente para potencial toxigênico através da expressão da PLD pelo teste de CAMP (CHRISTIE; ATKINS; MUNCH-PETERSON, 1944) em placas de ágar sangue de carneiro 5% semeada com amostra de *S. aureus* β -hemolítico, formando uma linha no meio da placa. Amostras produtoras de PLD inibem a hemólise causada pelo *S. aureus*, formando uma seta inversa, denominada Camp-reverso.

Como método genotípico foi realizada PCR com oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *pld* de amostras previamente confirmadas como pertencentes à espécie *C. ulcerans* (*pld*-R1 e *pld*-F) baseado em método descrito anteriormente por Pacheco *et al.* (2007).

3.6 Sequenciamento do genoma da amostra PLD-negativa 2590

Uma vez que a amostra bacteriana de *C. ulcerans* 2590 não expressou a PLD, sem formar halo reverso em teste CAMP, foi encaminhada para o sequenciamento do genoma no Laboratório de Ciências Celulares e Moleculares da Faculdade de Ciências de Saúde e Vida da Universidade de Northumbria, Reino Unido, sob coordenação do Prof. Dr. Vartul Sangal, para confirmação da espécie *C. ulcerans* e presença do gene *pld*. A amostra 2649 foi igualmente encaminhada para sequenciamento.

Resumidamente, as amostras 2590 e 2649 foram crescidas em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) a 37°C e o DNA genômico extraído através do UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MoBio) e então sequenciado pelo equipamento Illumina MiSeq. Os pares foram lidos e combinados usando SPAdes 3.9.0 (Bankevich) e os genomas depositados no GenBank (SUBEDI *et al.*, 2018).

3.7 Análise filogenética do gene *pld*

A sequência do gene *pld* da amostra 2590 foi comparada com sequências gênicas de amostras das espécies produtoras de PLD, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, cujos genomas sequenciados encontram-se depositados no *GenBank*. O alinhamento usou como referência a sequência do gene *pld* (CULC22_00038) da amostra BR-AD22. As sequências foram comparadas e alinhadas através do programa BLASTn (disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), usando o método Clustal W e a árvore filogenética construída através do método de agrupamento *Neighbor-joining*, usando do programa MEGA-6.

3.8 Avaliação da capacidade de interação bacteriana com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular de origem humana

Placas de microtitulação de 96 poços (Corning, NY, USA) foram utilizadas nos testes de ligação bacteriana usando Fibrinogênio (Fbg), Fibronectina (Fn) e colágeno Tipo I (Col-I) biotinizados (Sigma Chemical Co). As culturas bacterianas crescidas em caldo TSB por 24 h a 37 °C foram lavadas 2x com tampão salina fosfato (PBS), e ressuspensas em 0,1 M NaHCO₃, pH 9,6 a uma suspensão equivalente a 5 x 10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (DO 0,2 a $\lambda = 650$ nm). Os poços foram sensibilizados com 100 μ L de suspensão bacteriana por 1 h a 37 °C, e por uma noite a 8 °C. Uma curva padrão foi construída utilizando a diluição de soluções de proteínas biotinizadas em concentrações variando de 5 a 0,05 μ g (1 h/37 °C). Após bloqueio com 2% de soro albumina bovina (BSA tipo V, Sigma) em PBS acrescida com 0,05% Tween-20 (PBST) por 1 h a 37 °C, os poços foram lavados 3x com PBST. As amostras bacterianas reagiram com 20 μ g/mL de proteínas biotinizadas de Matriz Extracelular Celular (ECM)/plasma por 1 h a 37 °C. Depois de lavagem por 3x com PBST, Extravidina-Peroxidase (Sigma) 0,001 μ g/mL preparada em PBST 1% BSA foi adicionada aos poços por 30 min a 37 °C. Após nova lavagem com PBST (3x), a reação foi verificada pela adição de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) por 20 min e a reação bloqueada com 50 μ L de HCl 1 M. A leitura da reação foi realizada a $\lambda = 450$ nm em leitor de placa de microtitulação e a intensidade da cor dos poços sensibilizados com os micro-organismos comparada à curva padrão pelo GraphPad Prism versão 7.0. Os resultados foram expressos em micro-organismos aderidos às proteínas, com uma média \pm desvio padrão (SD) de três ensaios independentes realizados em triplicata. As médias das propriedades de ligação foram comparadas pelo teste

Anova (HARLOW; LANE, 1988; SABBADINI *et al.*, 2010; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014).

3.9 Análise quantitativa da capacidade de interação bacteriana com superfície abiótica

A formação de biofilme foi avaliada quantitativamente através da remoção dos microorganismos associados à superfície das lamínulas por força mecânica (areia estéril e agitação) e posterior contagem das UFC em placas de meio sólido (DONLAN *et al.*, 2001). As amostras de *C. ulcerans* utilizadas nesse estudo foram: BR-AD22 PLD-positiva e *tox*-negativa e a mutante para *pld* ELHA-1, 2590 PLD-negativa e *tox*-negativa e 210932 *tox*-positiva e PLD-positiva. A amostra de *Corynebacterium striatum* 1987, formadora de biofilme, foi incluída como controle positivo.

Lamínulas de Thermanox™ foram colocadas nos poços de placas de poliestireno e infectadas com suspensões bacterianas na DO 0,2 = λ 580 nm por 24 h a 37°C. Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas 3x em PBS e então colocadas em tubos de vidro (13 x 100 mm) contendo areia estéril e levadas ao agitador durante 1 min. Após a sedimentação da areia, foram retirados 100 μ L de cada tubo e realizada a diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-6} de cada amostra em PBS. Inóculos (10 μ L) foram semeados em triplicata em placas de TSA, por um período de incubação de 48 h a 37 °C (TENNEY *et al.*, 1986, DONLAN *et al.*, 2001) e as UFC foram contadas. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prisma 7.0 pelo teste Anova.

3.10 Ensaios moleculares relacionados à construção de mutante com cópia truncada para o gene *pld*

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Friederich-Alexander Erlangen-Nuremberg (FAU), Alemanha, sob orientação do Prof. Dr. Andreas Burkovski. Todos os equipamentos, reagentes, metodologias e células foram disponibilizados gentilmente para uso no projeto de pesquisa.

3.10.1 Análises em bioinformática

Sequências oligonucleotídicas iniciadoras baseadas na sequência do gene *pld* da amostra de *C. ulcerans* 2590 foram desenhadas *in silico* através do programa *Clone Manager* (*Scientific*

& Educational Software) com o objetivo de construir o gene de cópia truncada (clonagem) (Tabela 4). Os iniciadores utilizados foram sintetizados por Eurofins Genomics (Ebersberg) e dissolvidos em água destilada numa concentração final de 10 pmol/μL.

Tabela 4 - Sequências oligonucleotídicas iniciadoras empregadas na construção de gene *pld* de cópia truncada

<i>pld-XmaI-s</i>	5'-CGCG CCCGGGACCTGGCTCGATATTAAGAATCCTGA-3'
<i>pld-XmaI-as</i>	5'-CGCG CCCGGGCCAAAGATCATTCCGTCTAC-3'
<i>PLDmut_2590_XmaI-s</i>	5'-GCGC CCCGGGCGCGAATGCACTCGAAATTG-3'
<i>PLDmut_2590_XmaI-as</i>	5'-GCGC CCCGGGGATCGCATGTCTTGTTCCTAGG-3'
<i>PLD_mut2_2590-as</i>	5'-GCGC GGGCCCGTCTACGTGGGCTTTCCTAGG
<i>PLD_mut2_2590-s</i>	5'-GCGC CCCGGGTCCTCACTACCCAAGGCG-3'

Fonte: (Da autora, 2017).

A temperatura de anelamento (T_a) foi calculada segundo a equação abaixo, sendo N o conteúdo de nucleotídeos.

$$T_a = [N (\text{adenina, timina}) \times 2^\circ \text{C} + N (\text{guanina, citosina}) \times 4^\circ \text{C}] - 4$$

Esta temperatura corresponde à temperatura de desnaturação de ligações de hidrogênio, menos 4 °C, para que ocorra uma ligação estável com o molde de DNA. A PCR foi realizada contendo um volume final de 25 μL, 0,5 μL de DNA (100 ng. μL⁻¹), 5,0 μL do tampão 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 2,0 μL de MgCl₂ (25 mM) (Promega), 2 mL dNTP (10mM) (Promega), 0,5 μL de cada iniciador (10 pMol/μL), 0,125 μL da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 15,37 μL de água mili-Q estéril. As reações foram realizadas em termociclador Primus 96 avançado (Peqlab, Erlangen), utilizando o seguinte programa: etapa inicial de desnaturação a 98 °C por 5 min; 30 ciclos de uma etapa de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 30 seg e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min (HACKER, 2011).

3.10.2 Análise dos produtos amplificados

Os produtos de amplificação das reações foram revelados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,0% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), pH 8,0. A cada tubo de reação foram adicionados 5 μ L de *DNA Loading Dye Buffer* (ThermoFisher Scientific) e a solução imediatamente aplicada ao gel de agarose. O sistema foi submetido à corrente de 100 V durante 1 h em cuba de eletroforese horizontal Modelo 11.14 (Gibco-BRL). Para determinar o tamanho dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Gibco-BRL). Para detecção visual das bandas, os géis foram corados em solução aquosa de brometo de etídio e observados em radiação UV (366 nm). A amplificação foi considerada positiva pelo aparecimento da banda com peso molecular esperado (SANTOS *et al.*, 2010; HACKER, 2011).

3.10.2.1 Extração do DNA bacteriano

O DNA cromossômico foi obtido por extração com fenol-clorofórmio. Para este fim, após 24 h de crescimento, a amostra foi centrifugada (4.500 x g, 15 min, temperatura ambiente) e ressuspensa em 3 mL de tampão Tris-EDTA (TE pH 8). Lisozima e 30 μ L de uma solução de 10 mg/mL de RNase foram adicionadas a solução. A mistura foi agitada em agitador orbital (Edmund Buhler GmbH, Tubingen) a 125 rpm, na temperatura de 37°C durante 90 min, e em seguida, 210 μ L de SDS a 20% e 30 μ L de uma solução a 20 mg/ μ L de proteinase K foram adicionados e a solução foi agitada vigorosamente por inversão. Após incubação durante 2 h a 65 °C, 600 μ L de cloreto de sódio a 5 M foram adicionados e a mistura foi novamente submetida e uma incubação adicional a 65 °C durante 60 min.

Para separar o ácido nucleico das proteínas e detritos celulares, 4,5 mL de uma mistura de clorofórmio: fenol: álcool isoamílico (25: 24: 1) foi adicionada e a suspensão foi posteriormente centrifugada (8900 x g, 15 min, 4 °C). A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo sendo adicionados 4,5 mL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para ser novamente centrifugada sob as mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para um tubo com 3 mL de álcool isopropílico e o tubo foi invertido várias vezes até que o precipitado de DNA cromossômico fosse formado. O DNA precipitado foi lavado 2x com 500 μ L de etanol a 70% (13.000 x g, 10 min, temperatura ambiente) e seco em Savant DNA 110 SpeedVac®. Para dissolver o DNA cromossômico, 100 μ L de tampão TE (pH 8)

foram adicionados e a amostra incubada durante a noite à temperatura ambiente (HACKER, 2011; HACKER *et al.*, 2015; GREEN; SAMBROOK, 2012)

3.10.2.2 Obtenção do fragmento para interromper o gene *pld*

Um fragmento de DNA de uma região interna do gene *pld* foi amplificado por meio do uso de iniciadores específicos desenhados descritos acima (**Tabela 4**), a partir do DNA genômico da amostra de *C. ulcerans* 2590. A PCR foi empregada contendo um volume final de 50 μL apresentando 2,0 μL de DNA (100 ng. μL^{-1}), 10 μL do tampão 5x *Phusion HF Buffer* (ThermoFisher), 1,0 μL de dNTP (10mM) (Promega), 1,0 μL de cada iniciador citado anteriormente na **Tabela 4** (10 pMol/ μL); 1,0 μL da enzima *Phusion High-Fidelity DNA* Polimerase (ThermoFisher) e 34,0 μL de água milli-Q estéril. A amplificação foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) nas seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min; 35 ciclos das etapas de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 58 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min.

A seguir, uma alíquota de 2 μL do produto dessa amplificação foi submetida à resolução eletroforética para que a sua qualidade e o tamanho do fragmento amplificado fossem estimados. O fragmento de DNA foi extraído a partir do gel de agarose 1% utilizando o kit de NucleoSpin® Extracto II (Macherey - Nagel, Duren) de acordo com as recomendações do fabricante (HACKER, 2011, GREEN; SAMBROOK, 2012, HACKER *et al.*, 2015).

3.10.2.3 Restrição do fragmento de DNA

A restrição de moléculas de DNA (0,5-5 μg) foi realizada para obter extremidades compatíveis de inserção do fragmento de DNA para a geração de novos plasmídeos vetores. Nesse estudo foi utilizado o plasmídeo vetor pK18mob não replicativo em *Corynebacterium* sp (SCHÄFER *et al.*, 1994). Endonucleases de restrição de corte único (*XmaI/SmaI*) foram testadas (1 U/ μg DNA). A reação foi realizada segundo instruções do fabricante e as enzimas e o tampão (*CutSmart Buffer-1/10* do volume total) foram adquiridos na New England Biolabs (Frankfurt/Main). A reação de restrição com volume total de 25 μL foi realizada a 37 °C durante 1 h.

Após a reação de restrição, a solução foi incubada a 65 °C durante 20 min para interromper a ação enzimática e o DNA foi purificado utilizando o kit NucleoSpin® *Gel* e *PCR*

Clean Up (Macherey - Nagel, Duren) (HACKER, 2011; GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015).

3.10.2.4 Desfosforilação da extremidade 5' do vetor *pK18mob* e ligação dos fragmentos de DNA

Para evitar a auto ligação dos vetores linearizados com extremidades compatíveis, a desfosforilação das suas extremidades 5' foi realizada utilizando fosfatase alcalina rápida (Roche Applied Science, Mannheim). Em resumo, 0,5 µl da enzima e 1,5 µl de tampão fosfatase foram adicionados a 10 µl de reação de restrição e adicionada água até o volume final de 25 µl. A solução foi incubada a 37 °C durante 30 min e 74 °C por 2 min e os plasmídeos *pK18mob* desfosforilados foram submetidos a eletroforese e a banda no tamanho esperado foi excisada com ajuda de um bisturi (HACKER, 2011; GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015). Os plasmídeos foram eluídos do gel utilizando o kit NucleoSpin® Extracto II (Macherey - Nagel, Duren) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a purificação dos plasmídeos e do inserto a concentração de DNA de ambos foi determinada em comprimento de onda de 260 nm em Nanodrop® spectofotometer ND-100 (Peqlab, Erlangen). A ligação de fragmentos de DNA foi realizada com 3 µl da enzima T4 DNA ligase (NEB, Frankfurt/ Main) que associa o grupamento 5'-fosfatos e 3'-OH covalentemente e tampão ligase 1 µl (NEB, Frankfurt/ Main) num volume total de 30 µl de água destilada. O vetor *pK18mob* e o fragmento interno do gene *pld* foram ligados numa razão molar de cerca de 1:5 durante 3 h à temperatura ambiente (HACKER, 2011, GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015). O volume de DNA e vector foram calculados usando a seguinte fórmula, onde Kb corresponde ao tamanho do inserto e do vetor (pb), e N a concentração de nucleotídeos extraída.

$$Ng \text{ do inserto} = 5 \times ng \text{ vector} \times kb \text{ inserto} / kb \text{ vector}$$

3.10.2.5 Produção de *E. coli* DH5αMCR quimiocompetente

Para preparar *E. coli* DH5αMCR quimiocompetente, 100 ml de Luria-Bertani (LB) foram inoculados com uma cultura de *E. coli* DH5αMCR crescida durante aproximadamente 12 h. A concentração de bactéria transferida foi calculada para que fosse atingida a DO 0,1 λ = 600 nm inicial. O inóculo foi levado a incubação a 37 °C e 135 rpm (Orbital Shaker, Edmund Bühler GmbH, Tübingen) até atingir a DO 0,4 λ = 600 nm. O inóculo foi centrifugado (4.000

x g, 10 min, 4 °C), ressuspensão em 40 mL de CaCl₂ 0,05 M gelado e colocado em gelo por 30 min. Após incubação, as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições descritas acima e ressuspensas em 5 mL de CaCl₂ 0,05 M gelado e colocadas por mais 10 min no gelo. Em seguida, 1,3 mL de glicerol 87% gelado foram adicionados e alíquotas de 100 µL foram congeladas em nitrogênio líquido. As células competentes foram armazenadas a -80 °C (GREEN; SAMBROOK, 2012).

3.10.2.6 Transformação em *E. coli* DH5αMCR e BL-21 quimiocompetentes

Para transformar *E. coli* para a amplificação do plasmídeo após ligação, 100 µL de *E. coli* quimiocompetentes foram descongeladas em recipientes com gelo e em seguida adicionadas a solução de ligação (vetor + inserto), essa mistura foi colocada em gelo por 30 min e em seguida submetida a choque térmico por 60 seg a 42 °C e novamente gelo por 5 min. Após esse período 400 µL de caldo LB foram colocados nos microtubos com *E. coli* transformadas com o plasmídeo. A suspensão resultante foi submetida à agitação a 7.000 rpm (Thermoblock) por 1 h a 37 °C. Após esta etapa a suspensão foi centrifugada a 11300 x g por 1 min (MiniSpin Eppendorf®) o sobrenadante descartado e 20 µL com as células transformadas foram semeados em placas com meio ágar LB suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina (marcador integrado ao vetor pK18mob), as placas foram mantidas a 37 °C por aproximadamente 18 h. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao referido antibiótico. Colônias (clones) de cada placa foram selecionadas para extração plasmidial, para confirmação da clonagem do fragmento interno do gene *pld* em vetor pK18mob (HACKER, 2011; GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015,).

3.10.2.7 Extração do DNA plasmidial amplificado em *E. coli* DH5αMCR e LB-21

As colônias de *E. coli* crescidas nas placas com antibiótico foram semeadas em caldo LB com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina e incubadas em estufa a 37 °C com agitação a 125 rpm/min por uma noite. Dos inóculos positivos para o crescimento bacteriano, 4 mL foram extraídos e purificados utilizando o kit comercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey- Nagel, Duren) de acordo com instruções do fabricante. A concentração de DNA plasmidial foi determinada em comprimento de onda de 260 nm em Nanodrop® spectofotometer ND-100 (Peqlab, Erlangen). A pureza foi analisada pela determinação do coeficiente A₂₆₀/A₂₈₀, que deve estar entre 1,8-2,0 para que o DNA extraído possa ser considerado de qualidade (GREEN; SAMBROOK, 2012).

3.10.2.8 Produção de *C. ulcerans* eletrocompetente

Após a confirmação da clonagem do fragmento interno do gene no vetor pK18mob, células de *C. ulcerans* eletrocompetentes foram preparadas para transformação com o plasmídeo. Inicialmente, 20 mL de caldo *Heart Infusion* (HI) foram inoculados e deixados por uma noite em estufa a 37 °C e em agitação a 125 rpm. Após o crescimento do inóculo uma subcultura foi preparada com 10 mL de caldo HI e transferida para 200 mL de meio BHI-ZSS (37 g de BHI, 20 g glicina e 150 g de sacarose em um litro de água destilada) com DO 0,1 λ = 600 nm inicial. A amostra foi transferida para o agitador a 37 °C/135 rpm (Orbital Shaker, Edmund Bühler GmbH, Tübingen) e o inóculo crescido até a DO 0,4-0,6 λ = 600 nm. A suspensão bacteriana foi dividida em quatro alíquotas de 50 mL e colocadas em gelo por 1 h e depois centrifugadas a 4000 x g /4 °C (Eppendorf 5804R) por 20 min e o seu sobrenadante foi descartado. As bactérias foram lavadas duas vezes com 50 mL de glicerol 15% (v/v) gelado (5000 x g, 5 min, 4 °C) e em seguida o número de tubos foi reduzido para dois, de modo que foram adicionados 25 ml de glicerol 15% em apenas dois tubos e o *pellet* ressuspensão e transferido para os tubos restantes, sendo lavado pela última vez. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de glicerol 15% gelado estéril foi adicionado a cada tubo, para ressuspender o *pellet* restante. Depois de homogeneizados, os dois volumes foram acondicionados em um só tubo. Alíquotas de 100 μ L foram divididas em criotubos e estocadas a -80 °C (HACKER, 2011; GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015).

3.10.2.9 Transformação em *C. ulcerans*

As células eletrocompetentes de *C. ulcerans* previamente confeccionadas foram transformadas com o produto da extração de DNA plasmidial para gerar a linhagem mutante através de eventos de recombinação homóloga simples entre o plasmídeo pK18mob contendo o fragmento interno do gene *pld*.

As células eletrocompetentes de *C. ulcerans* foram descongeladas em recipiente com gelo e alíquotas de 100 μ L foram gentilmente misturadas com 1 μ g – 7 μ g do plasmídeo ligado ao fragmento interno do gene *pld* e colocadas em gelo por 20 min. A suspensão foi adicionada a cubetas previamente mantidas no gelo (Peqlab, Erlangen). A eletroporação foi realizada utilizando Genepulser II (Bio-Rad, Munich) seguindo os parâmetros: 2,5 kV; 200 Ω ; 25 μ F. Após eletroporação, as bactérias foram transferidas para 1 mL de HI e incubadas a 37 °C por 2 h e 125 rpm (Orbital shaker, Edmund Bühler GmbH, Tübingen).

O processo de seleção dos transformantes constituiu-se no plaqueamento, com o auxílio de uma alça de Drigalski, de alíquotas de 200 μL da cultura em meio HI sólido acrescido do antibiótico canamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}/48\text{h}$ e após esse período observadas para a presença de colônias de *C. ulcerans* resistentes ao antibiótico. As colônias foram selecionadas e semeadas em novas placas com canamicina $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$; e em caso de crescimento de colônias, foram novamente semeadas em meio com canamicina $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As colônias resistentes para essa concentração do antibiótico foram selecionadas para teste fenotípico de expressão de PLD e estocadas em glicerol a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ (HACKER, 2011; GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015).

3.11 Clonagem das amostras de *C. ulcerans* com plasmídeos pXMJ19mcherry e pEPR1p45gfp

As etapas de transformação em *E. coli* quimiocompetentes e transformação em *C. ulcerans* eletrocompetentes foram executadas como as descritas nos itens 3.10.2.6 a 3.10.2.9. Os plasmídeos pXMJ19mCherry (JAKOBY; NGOUOTO-NKILI, BURKOVSKI, 1999) e pEPR1p45gfp (KNOPPOVÁ *et al.*, 2007) já se encontravam ligados e disponíveis para uso no Laboratório de Microbiologia da instituição alemã.

3.11.1 Seleção dos clones positivos para o plasmídeo pXMJ19mcherry

Após a etapa de transformação de *C. ulcerans* com o plasmídeo pXMJ19mCherry, alíquotas de 200 μL da cultura foram semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalski em meio HI sólido acrescido do antibiótico cloranfenicol $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (marcador integrado ao vetor pXMJ19). As placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}/48 \text{ h}$ e após esse período observadas para a presença de colônias de *C. ulcerans* resistentes a esse antibiótico. As colônias foram selecionadas e semeadas em outras placas com cloranfenicol $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As colônias resistentes para essa concentração do antibiótico foram selecionadas para nova semeadura em 20 mL de caldo HI contendo cloranfenicol $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 2 h o meio foi acrescido do promotor de expressão isopropil-b-D-tiogalactopiranosida (IPTG) 1 mM e os frascos incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}/48 \text{ h}$ a 125 rpm. Para confirmação da clonagem as células foram observadas em microscopia de fluorescência (Leica DMR fluorescence microscope). O comprimento de onda para excitação das células com pXMJ19mcherry foi de 587 nm e emissão de 600-620 nm (HACKER, 2011; GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015).

3.11.2 Seleção dos clones positivos para o plasmídeo pEPR1p45gfp

Todas as etapas foram iguais ao processo de clonagem de *C. ulcerans* descritas no item 3.11.1, exceto pelo antibiótico de resistência usado nesse experimento, canamicina (marcador integrado ao vetor pEPR1p45gfp) ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e do comprimento de onda para excitação do pEPR1p45gfp, que foi de 395 nm e de emissão de 490 a 520 nm (HACKER, 2011; GREEN; SAMBROOK, 2012; HACKER *et al.*, 2015).

3.12 Análise através de modelo experimental *in vivo* da influência de PLD na mortalidade e alterações morfológicas de nematódeos *Caenorhabditis elegans*

O nematódeo *C. elegans* N2 foi utilizado nos ensaios como um dos modelos experimentais *in vivo* para análise da patogenicidade das amostras de *C. ulcerans* selvagens e mutante. Os nematódeos foram mantidos em placas contendo meio de crescimento para nematódeos (NGM) por aproximadamente 4 dias a 20°C , utilizando a cepa *E. coli* OP50 como fonte de alimento. Para os ensaios de infecção, $20 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana (1×10^9 UFC), obtida a partir de uma cultura de 24 h em TSB, foram semeados em placas de NGM contendo $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ácido nalidíxico (AN) e incubados a $37^\circ\text{C}/48$ h. Após o crescimento bacteriano, 20 vermes em estágio larval L4 foram transferidos para placas contendo as amostras teste, que foram observadas diariamente durante 5 dias, contando-se os vermes mortos/vivos/desaparecidos. *E. coli* OP50 foi incluída no estudo como controle negativo. Para cada amostra, foram realizadas três placas. Os números de vermes mortos ou desaparecidos foram utilizados nas análises estatísticas (OTT *et al.*, 2012). Os resultados de cada amostra foram analisados pelo programa GraphPad Prism 7.0 pelo teste não-paramétrico Anova. Paralelamente, alterações fisiológicas e/ou morfológicas foram avaliadas nos vermes adultos e larvas.

Adicionalmente, as amostras de *C. ulcerans* 2590, 2649 e 809 contendo plasmídeo PXMJ19mCherry e induzidas com promotor de expressão IPTG foram semeadas em placas de NGM com AN para ensaios de infecção por microscopia de fluorescência (Leica DMR). Os nematódeos foram colocados em placa com o crescimento bacteriano. Após 24 h, os vermes foram transferidos para placa com *E. coli* OP50 por mais 24 h para permitir a limpeza de intestino, de debris celulares e do excesso de bactérias aderidas externamente. Os vermes foram então selecionados, montados em uma lâmina de vidro coberta por uma película de gel de

agarose e uma gota de azida sódica (20 mM) para promover sua paralisia, recobertos com lamínula.

3.13 Avaliação do potencial de virulência das amostras empregando modelo experimental *in vivo* em lagartas de *Galleria mellonella*

Foram testadas as amostras de *C. ulcerans*, além de dois grupos-controle: um negativo injetado somente com solução tampão de MgSO₄ e um controle com corinebactéria não-patogênica (*Corynebacterium glutamicum*), segundo estudos prévios (OTT et al, 2012). Alíquotas de 20 mL de caldo TSB foram inoculadas com bactérias de uma cultura *overnight* na DO 0,1 $\lambda = 600$ nm inicial e colocadas num agitador a 37 °C até que a DO 0,6 $\lambda = 600$ nm fosse alcançada. A suspensão bacteriana foi então centrifugada (10 min, 4.500 x g, 4°C) e ressuspensa em 500 μ L MgSO₄ 10 mM em uma DO 5 $\lambda = 600$ nm (aproximadamente $1,5 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹). Para a infecção, alíquotas de 5 μ L foram injetadas com uma seringa de Hamilton 50 μ L nas larvas via pseudópodo inferior esquerdo. Para cada amostra foram infectadas cinco larvas e incubadas a 25°C por 5 dias, sendo observadas a cada 24 h (JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; OTT *et al.*, 2012).

3.14 Avaliação do perfil hematológico e indução de lesão cutânea de murinos pós-infectados com *C. ulcerans*

Quinze camundongos Swiss-Webster, 6 semanas de idade, sexo masculino, foram separados em caixas em grupos de três para cada amostra estudada (n=4) mais o controle negativo e aclimatizados durante uma semana antes da realização do experimento.

As amostras testadas (**Tabela 5**) foram crescidas em TSB e o inóculo bacteriano contendo 1×10^9 UFC por amostra de *C. ulcerans* teve como veículo solução salina estéril. Os animais foram infectados através da veia caudal com 0,1 mL do inóculo; três animais foram reservados como controle-negativo e inoculados somente com solução salina estéril (DIAS et al, 2011b). O experimento foi realizado em um único dia. Os camundongos foram então observados durante o período de uma semana em relação à formação de lesões cutâneas (úlceras) e artrite, modificação de comportamento e eventual óbito. Ao fim do período de observação, os animais foram anestesiados via intra-peritonial com quetamina (75-150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). O sangue foi coletado (1 mL) através de punção cardíaca e envasados em tubos de coleta pediátricos contendo solução anti-coagulante (EDTA K2). Antes da coleta,

uma gota de EDTA foi aspirada pela agulha para evitar a formação de trombos no momento da coleta. A análise clínica do sangue foi realizada no mesmo dia em Contador Hematológico Automatizado Veterinário Sysmex® - Poch 100 iV, em parceria com o Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Ao fim do experimento os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia, em estrito acordo com as leis brasileiras de ética em experimentação animal (BRASIL, 2013b). As coletas e eutanásia foram realizadas no mesmo dia em todos os animais.

Tabela 5 - Amostras de *C. ulcerans* em ensaio de infecção em camundongos.

Amostras	Fonte	<i>pld</i> gene	<i>tox</i> gene	CAMP Reverso	Referência
2590	Homem	+	-	-	Subedi et al, 2018
BR-AD22	Cão	+	-	+	Dias et al, 2010
ELHA1- <i>pld</i> _mutante	Cão	truncado	+	-	Hacker et al, 2015
210932	Homem	+	+	+	Viana et al, 2014

+: presença; -: ausência.
Fonte: Da autora, 2017.

3.15 Influência de concentrações de ferro na expressão de fosfolipase D

Uma vez que foi previamente demonstrado que alterações dos níveis de ferro influenciavam na expressão de potencial de virulência (MOREIRA *et al.*, 2003), foi realizado ensaio adaptado de Moreira et al (2003) para avaliar a interferência da concentração de ferro na atividade fosfolipásica. Resumidamente, foram preparados meios em caldo TSB suplementado com Fe (FeCl₃) 4 mM e caldo TSB com 2,2'-dipiridil (Sigma-Aldrich) 0,5 mM, para sequestro do ferro livre. Tubos de vidro (13 x 100mm) com os dois tipos de meio foram inoculados com cada amostra de *C. ulcerans*. Os tubos foram colocados em agitador orbital com incubadora (Lab-line Environ Shaker) durante 24 h a 37 °C e 125 rpm. Após o crescimento bacteriano, foi

realizado o teste CAMP com amostras crescidas nas diferentes concentrações de ferro e resultado lido em 48 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.16 Pesquisa da capacidade de interação bacteriana com macrófagos humanos e células HeLa

3.16.1 Interação bacteriana com macrófagos U-937

As amostras bacterianas foram crescidas em caldo TSB por incubação a 37 °C/48 h, em seguida, lavadas três vezes com *Dulbecco modified phosphorus buffer saline solution* (PBS-D) (pH 7,2, 0,01M) e ressuspensas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma) até alcançar a DO 0,1 $\lambda = 580\text{nm}$ (10^7 UFC).

Após os períodos de infecção dos macrófagos U-937 com a suspensão bacteriana, alíquotas do meio de cultivo celular foram reservadas para a contagem de bactérias viáveis livres no sobrenadante, em seguida, os tapetes foram lavados 4x com 500 μL de PBS-D para eliminação das bactérias não associadas e de resíduos do meio de cultivo celular, a seguir os tapetes celulares foram lavados e tratados com 500 μL de PBS-D contendo 0,1% de Triton X-100 (Biorad Laboratories, Richmond, Ca, EUA) por 30 seg, para que ocorresse a lise das células. Diluições das alíquotas reservadas e dos lisados celulares foram plaqueadas em meio TSA, permitindo a contagem de bactérias viáveis associadas ao tapete celular.

Ao final dos intervalos de infecção, alguns poços foram expostos a 500 μL de uma solução de gentamicina ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) durante 1 h, com a finalidade de eliminar bactérias extracelulares aderidas às monocamadas (exclusão pela gentamicina) permitindo a contagem de bactérias internalizadas. As contagens resultaram no número total de bactérias associadas ao tapete (intracelulares + extracelulares) e no número de bactérias ocupando localização intracelular. Os percentuais de aderência e viabilidade intracelular foram calculados a partir das relações entre os números de bactérias associadas e/ou internalizadas com as contagens de bactérias viáveis no sobrenadante somado ao número de células viáveis associadas às monocamadas (SANTOS *et al.*, 2010; HACKER *et al.*, 2016b). Os resultados foram expressos em média de três ensaios independentes realizados em triplicata e comparados pelo teste não-paramétrico Anova.

3.16.2 Interação com células HeLa

Células HeLa (Henrietta Lacks-células humanas de câncer de cérvix) foram mantidas em meio DMEM, acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10% e antibiótico (gentamicina 100 mg. mL⁻¹) (DMEM+). Para manutenção das células, os tapetes foram lavados e as células desprendidas com Accutase (Tripsina) a 37 °C/5 min e centrifugadas a 300 x g/5 min em temperatura ambiente e então ressuspensas em DMEM +. Uma alíquota foi retirada para a nova placa em meio de DMEM + (1:10).

Para o experimento de interação (aderência e invasão), células HeLa foram crescidas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) na densidade de 1 x 10⁵ células por poço. As amostras foram semeadas em 20 mL de caldo HI e incubadas por 24 h/37°C. As bactérias foram centrifugadas e a densidade celular ajustada para DO 1 (600 nm). Uma suspensão-padrão do inóculo com a multiplicidade de infecção (MOI) de 50, preparada em DMEM e 500 µl usados para infectar as células em cada poço. As placas (uma para aderência e outra para invasão) contendo as células foram então retiradas da estufa, o meio DMEM+ aspirado e os poços lavados 3x com PBS, em seguida, os poços foram preenchidos com 500 µL da suspensão-padrão, as placas foram centrifugadas por 5 min a 300 x g e incubadas por 90 min. Para semear o inóculo inicial de cada amostra, foram reservados 500 µL e uma diluição seriada até 10⁻⁴ foi plaqueada em ágar sangue.

Após o tempo de incubação inicial, a placa para ensaio de invasão foi retirada, o meio aspirado e colocado meio DMEM+ e novamente incubada a 37 °C/2 h. A placa para ensaio de aderência foi retirada e lavada com o mesmo procedimento descrito anteriormente. Tripsina (500 µL) foi adicionada a cada poço e a placa incubada a 37 °C/5 min, para destacar as células. Após o período de incubação, Tween 20% (12,5 mL) foi acrescentado aos poços e a placa novamente colocada em estufa por 37 °C/5 min, para romper as células. O líquido dos poços foi então retirado e feitas diluições seriadas até 10⁻³ e então plaqueadas em ágar sangue. Após duas horas, a placa para ensaio de invasão foi retirada da estufa, o meio aspirado, e foi praticado o mesmo procedimento descrito anteriormente a partir da tripsina. A diluição plaqueada foi 10⁻².

Para o cálculo de bactérias aderidas e internalizadas (invasão), foi utilizado o total de bactérias aderidas subtraídas do total de bactérias internalizadas (HACKER *et al.*, 2015). Os resultados foram expressos em média de três ensaios independentes realizados em triplicata e comparados pelo teste não-paramétrico Anova.

3.17 Considerações éticas

O projeto está inscrito sob o protocolo CEUA nº 29/015 aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

4 RESULTADOS

4.1 Origem e identificação das amostras de *C. ulcerans* por métodos fenotípicos convencionais e semi-automatizado

Para a análise fenotípica das amostras de *C. ulcerans* 2590 e 2649 foram utilizados testes bioquímicos convencionais e o sistema semi-automatizado API-Coryne System V3.0. Para a amostra 2590, foi observada reação positiva para a fermentação dos açúcares glicose, manose, ribose; como também para os testes de catalase, DNase, PAL, β -GLU e α -GLU. Embora no teste DAU a ureia tenha se mostrado negativa, no teste API-Coryne a ureia foi positiva. Os resultados foram negativos para esculina, redução de nitrato, DAU, gelatinase, PYZ, PYRA, β -GAL, β -NAG, tirosina e para a fermentação dos açúcares: maltose, sacarose, frutose, galactose, manitol e xilose. Em contraste como o observado para a maioria das amostras de *C. ulcerans*, a amostra 2590 não apresentou formação de CAMP reverso e fluorescência no teste King B. O api-code encontrado foi 0115777, perfil inaceitável, com aproximação para *C. ulcerans*.

A análise da amostra de *C. ulcerans* 2649 apresentou resultados positivos para: catalase, DAU, PAL, fluorescência em teste de King B, teste de DNase, CAMP reverso e fermentação dos açúcares frutose, manose e ribose e negativos para esculina, redução de nitrato, gelatinase, PYZ, PYRA, α -GLU, β -GAL, β -NAG, tirosina e para a fermentação dos açúcares: glicose, maltose, sacarose, galactose, manitol e xilose. O api-code encontrado foi 0111304, muito boa identificação (99,3%). As demais amostras apresentadas na **Tabela 2** tiveram seus perfis analisados em estudos prévios (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2010; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014).

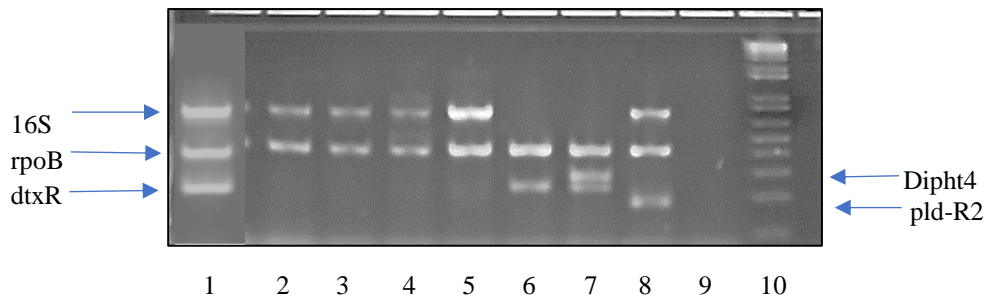
4.2 Identificação das amostras de *C. ulcerans* por técnicas moleculares

4.2.1 Identificação pela técnica de mPCR

As amostras 2649 e 2590 foram também identificadas como *C. ulcerans* pela técnica de mPCR usando sequências de oligonucleotídeos (*primers*) que diferenciam o gênero (*rpoB*) e as espécies (*16S rRNA* e *dtxR*). A detecção da toxigenicidade foi observada pela verificação da presença dos genes *pld* (*pld-R2*, gene específico de *C. pseudotuberculosis*) e *tox* (*diph4*, gene da toxina diftérica) (**Figura 1**). As demais amostras incluídas no estudo foram identificadas em

estudos prévios (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2010; SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2014).

Figura 1 - Multiplex-PCR de amostras de *C. ulcerans* para identificação de genes das espécies potencialmente produtoras de toxina diftérica (TD) (gene *diph4*) e fosfolipase D (PLD) (*pld* R2).



Poços: 1- 210932 TD+; 2- 2649 TD -; 3- 2590 TD-; 4- 2652 (*C. ulcerans*) TD-; 5- BR-AD22 TD-; 6- 27010 (controle *C. diphtheriae* TD-); 7-27012 (controle *C. diphtheriae* TD+); 8-19410 TD- (controle *C. pseudotuberculosis*); 9-água; 10- Peso molecular (100pb).

Fonte: (Da autora, 2015).

4.2.2 Identificação pela técnica de MALDI-TOF MS

As amostras bacterianas BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61, 809 e 210932 foram identificadas corretamente ao nível de espécie como *C. ulcerans*, de acordo com *score* de 2,0 a 2,5 (KONRAD *et al.*, 2010). As amostras 2590 e 2949 não alcançaram o *score* (2,0), sendo as mesmas identificadas ao nível de gênero *Corynebacterium* sp (Tabela 6).

Tabela 6 - Identificação de amostras de *C. ulcerans* pela técnica de MALDI-TOF MS

Amostra	Identificação por métodos moleculares		
	mPCR	MALDI-TOF	
		Score	Identificação
BR-AD41	<i>C. ulcerans</i>	2,268	<i>C. ulcerans</i>
BR-AD22	<i>C. ulcerans</i>	2,203	<i>C. ulcerans</i>
809	<i>C. ulcerans</i>	2,098	<i>C. ulcerans</i>
210932	<i>C. ulcerans</i>	2,072	<i>C. ulcerans</i>
BR-AD61	<i>C. ulcerans</i>	2,065	<i>C. ulcerans</i>
2649	<i>C. ulcerans</i>	1,953	<i>Corynebacterium</i> sp.
2590	<i>C. ulcerans</i>	1,934	<i>Corynebacterium</i> sp.

mPCR, multiplex – Reação em Cadeia da Polimerase.

Fonte: (Da autora, 2018).

4.3 Descrição do primeiro caso de difteria zoonótica associado a mononucleose infecciosa

O material exsudativo coletado da faringe do paciente com suspeita de difteria foi enviado para identificação no LDCIC/UERJ e analisado pelos métodos de identificação disponíveis na rotina laboratorial. A confirmação do micro-organismo isolado como *C. ulcerans* foi inconclusiva pelos testes bioquímicos, semi-automatizado API-Coryne e MALDI-TOF. Embora a identificação da amostra tenha sido positiva como *C. ulcerans* pela mPCR, a confirmação inequívoca foi alcançada através do sequenciamento do genoma total e do gene *pld*. Essa amostra foi denominada como 2590.

Investigação epidemiológica para portadores assintomáticos em comunicantes humanos (n=11) e animais (cavalos n=3 e cães=2) apresentou resultados negativos tanto para *C. diphtheriae* como *C. ulcerans*. Produto de origem láctea (queijo coalho) considerado como possível fonte de infecção foi avaliado em análise bromatológica, com resultados negativos. O paciente e os contatos (n=300), incluindo indivíduos imunizados da família e da comunidade receberam reforço vacinal.

Naquela oportunidade e na mesma localidade, dois animais (cães) foram identificados como portadores assintomáticos de amostras de *C. ulcerans* não produtoras de TD (2649 e 2652), não possuindo vínculo ou contato com o paciente da amostra 2590. O material foi coletado de nasofaringe em todos os animais, segundo dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Pernambuco.

Resultados positivos do teste do anticorpo do vírus de Epstein-bar (IgM-160 U/mL e IgG-144U/mL) confirmaram o primeiro caso de coinfeção de difteria zoonótica com MI.

4.4 Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade de oito amostras de *C. ulcerans*, de origens diversas, a 12 agentes antimicrobianos determinados pelo método de disco-difusão estão apresentados na **Tabela 7**. Foram observadas diferenças entre susceptibilidade/resistência de acordo com o método utilizado para avaliação, CLSI ou EUCAST-BrCAST para algumas amostras e agente antimicrobianos.

Tabela 7 - Perfis de susceptibilidade de amostras de *C. ulcerans*, de origens diversas, a 12 agentes antimicrobianos avaliados pelo método de disco-difusão, segundo CLSI/ EUCAST-BrCAST

Antimicrobianos	BR-AD22	ELHA-1	BR-AD41	BR-AD61	809	2590	2649	210932
Penicilina G 10/1UI	I/S	S/S	I/S	I/S	I/S	R/R	S/R	S
Ampicilina 10 µg	S	R	S	S	S	ND	S	S
Eritromicina 15 µg	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina 2 µg	R/R	R/R	R/R	R/R	I/R	I/R	S/S	R/R
Rifampicina 5 µg	S/S	I/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
Cefotaxime 30 µg	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem 10 µg	S	S	S	S	S	S	R	S
Gentamicina 10 µg	S/S	S/R	S/S	S/R	S/S	S/S	S/S	ND
Linezolida 30 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
Vancomicina 30 µg	S/S	R/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
Tetraciclina 30 µg	S/S	ND	S/S	S/S	S/S	S/R	S/S	S/S
Ciprofloxacina 5 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	R/R	S/S

S, sensível; I, sensibilidade intermediária; R, resistente; ND, não determinado; CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST-BrCAST; *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

Fonte: (Da autora, 2016).

As amostras de *C. ulcerans* BR-AD41, BR-AD61, BR-AD22 e 809 foram consideradas resistentes à penicilina G pelo CLSI (10 UI) e sensíveis quando avaliadas pelo EUCAST-BrCAST (1 UI). A amostra 2590 foi resistente a penicilina por ambos os protocolos. A amostra 2649 foi considerada resistente à penicilina na leitura pelo CLSI e sensível pelo EUCAST-BrCAST; além disso foi a única amostra resistente à ciprofloxacina e ao imipenem e sensível à clindamicina (CLSI/EUCAST-BrCAST).

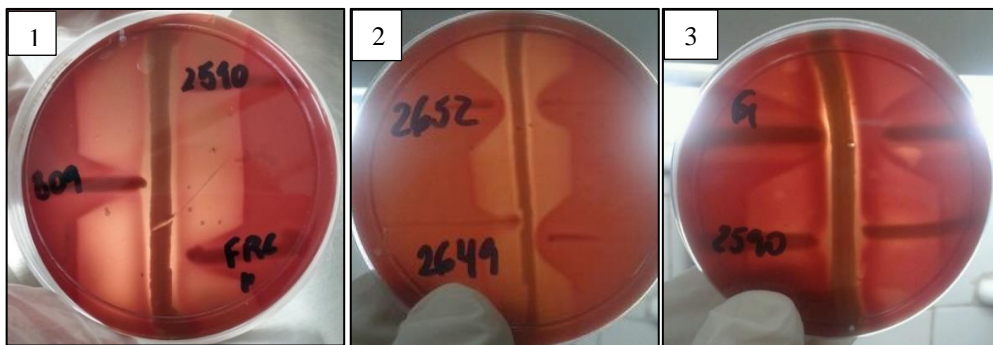
Diferente do observado para a amostra selvagem BR-AD22 e as demais testadas, a amostra mutante para o gene *pld* ELHA-1 mostrou-se resistente à ampicilina (EUCAST-BrCAST), porém apresentou sensibilidade à penicilina G pelos dois protocolos utilizados.

Não foram observadas amostras multi-resistentes tanto para as isoladas de humanos como de animais.

4.5 Pesquisa de atividade fosfolipásica através de métodos genotípicos e fenotípicos

As amostras foram avaliadas por método fenotípico para expressão de PLD pelo teste CAMP (**Figuras 2 A e B**). As amostras formadoras de CAMP reverso foram: BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61, 809, 210932 e 2649. As amostras 2590 (isolada do caso clínico descrito) e ELHA-1 (mutante para o gene *pld*) não exibiram CAMP-reverso. As amostras de *C. ulcerans* 2652, FRC11, 210931, 05-146 e 09363 foram utilizadas como controles positivos nessa etapa do estudo.

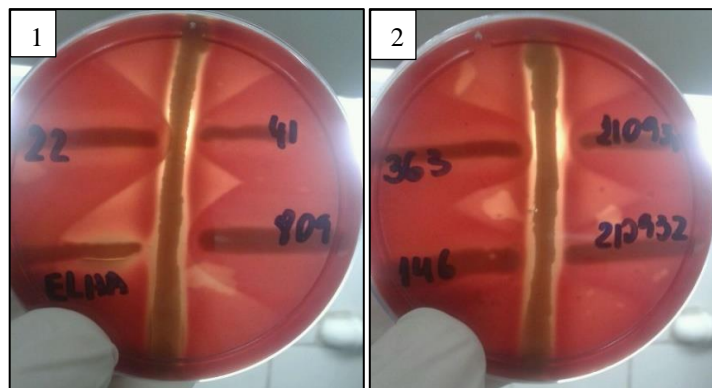
Figura 2 A- Resultados do teste de CAMP das amostras de *C. ulcerans*



A1 Amostras 809 e FRC-11, CAMP-reverso, 2590, CAMP-negativo; A2 Amostras 2652 e 2649, CAMP-reverso; A3 Amostras BR-AD61, CAMP-reverso, 2590, CAMP-negativo.

Fonte: (Da autora, 2015).

Figura 2 B- Resultados do teste de CAMP das amostras de *C. ulcerans*

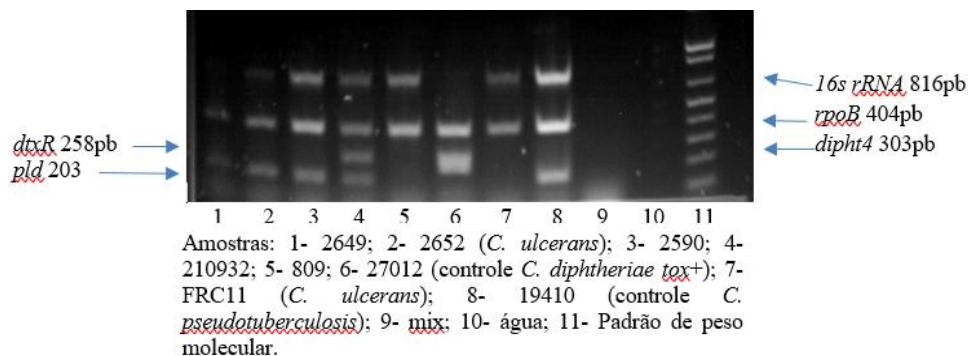


B1 Amostras BR-AD22, BR-AD41 e 809, CAMP-reverso, ELHA-1, CAMP-negativo; B2 Amostras 363, 146, 210932 e 210931, CAMP-reverso.

Fonte: (Da autora, 2015).

Uma vez que a amostra 2590 apresentou comportamento atípico, não apresentando a formação de halo reverso no teste CAMP, realizou-se a pesquisa do gene *pld* pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeo *pld*-R1, que amplifica genes *pld* de *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*. Todas as amostras do estudo amplificaram o gene *pld*, incluindo a amostra 2590 isolada do caso clínico (**Figura 3**). Interessantemente, as amostras 809 e FRC11, que expressaram atividade fosfolipásica, não amplificaram a sequência de oligonucleotídeos utilizada neste ensaio. A amostra FRC11 foi isolada em úlcera de paciente na França e incluída como controle no experimento.

Figura 3 - Multiplex-PCR de amostras de *C. ulcerans* para detecção do gene *pld* com oligonucleotídeo *pld*-R1.



Fonte: (Da autora, 2015).

4.6 Sequenciamento do genoma da amostra *pld*-negativa 2590

Os sequenciamentos dos genomas das amostras 2590 e 2649 confirmaram os isolados como *C. ulcerans* e foram depositados no *GenBank* sob o número de acesso MPSS00000000 e PST00000000 (SUBEDI *et al.*, 2018). Os genes *pld* apresentaram 924 pb. Os genomas e genes *pld* das demais amostras já possuíam o acesso disponíveis no *GenBank*, com exceção das amostras BR-AD41 e BR-AD61, cuja confirmação da espécie foi realizada pelo sequenciamento dos genes *rpoB* e *16S rRNA* (SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2014).

4.7 Análise filogenética e heterogeneidade do gene *pld*

A sequência completa do gene *pld* da amostra 2590 isolada do caso clínico foi comparada com sequências do gene *pld* de diversas amostras de *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* disponíveis no *GenBank*.

As sequências de gene *pld* de amostras de *C. ulcerans* obtiveram uma similaridade ou *e-value* de zero e cobertura (*query cover*) de 100%, significando que a probabilidade do alinhamento ser ao acaso foi nula, as sequências foram alinhadas totalmente e com uma identidade de 92 a 100% (**Quadro 1**).

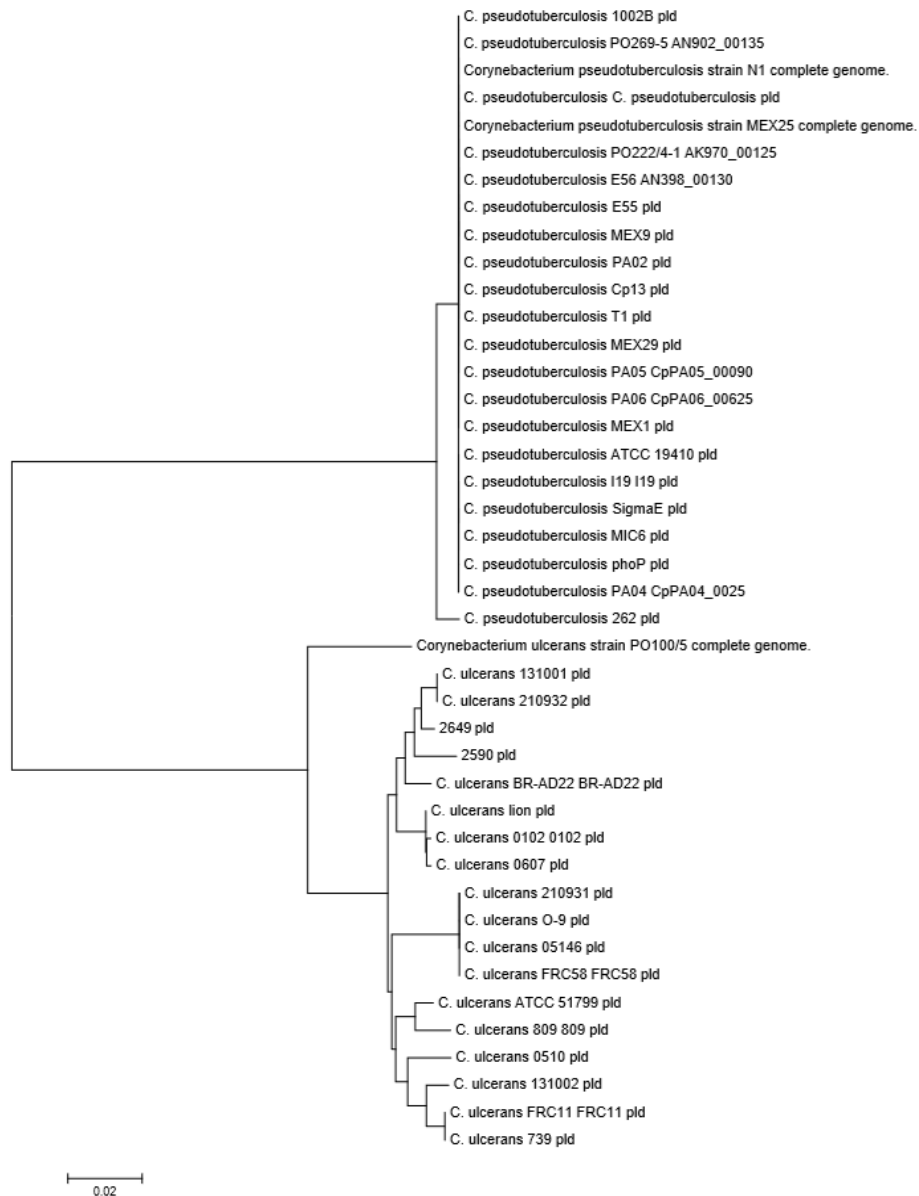
Quadro 1 - Alinhamento de sequências dos genes *pld* de amostras de *C. ulcerans*

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected: 0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans BR-AD22, complete genome	1596	1596	100%	0.0	100%	CP002791.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans 809, complete genome	1585	1585	100%	0.0	99%	CP002790.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans strain 131001, complete genome	1568	1568	100%	0.0	99%	CP010818.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans FRC58, complete genome	1568	1568	100%	0.0	99%	CP011913.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans strain 210931, complete genome	1568	1568	100%	0.0	99%	CP009583.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans strain 210932, complete genome	1568	1568	100%	0.0	99%	CP009500.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans strain NCTC7910 genome assembly, chromosome_1	1557	1557	100%	0.0	99%	LT906443.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans strain 05146, complete genome	1557	1557	100%	0.0	99%	CP009716.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans 0102 DNA, complete genome	1557	1557	100%	0.0	99%	AP012284.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans strain 131002, complete genome	1434	1434	99%	0.0	97%	CP011095.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans FRC11, complete genome	1428	1428	99%	0.0	97%	CP009622.1
<input type="checkbox"/> Convnebacterium ulcerans strain PO100/5, complete genome	1190	1190	99%	0.0	92%	CP021417.1

Fonte: (Da autora, 2017).

Com base no alinhamento, árvores filogenéticas foram construídas por diferentes métodos através do programa MEGA-6, apresentando robustez acima de 70%. O método de agrupamento escolhido foi o *Neighbor-joining* (*p-distance*) (**Figura 4**). Foi observado que a sequência do gene *pld* na espécie *C. pseudotuberculosis* apresenta uma alta similaridade genética, com todas as sequências em um ramo, com exceção de uma de *C. pseudotuberculosis* (262). Para a espécie *C. ulcerans* foi encontrada uma maior variabilidade na sequência de aminoácidos do gene *pld*.

Figura 4 - Árvore filogenética do gene *pld* de *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*



Barra de escala indica 0,02% de divergência. A espécie *C. pseudotuberculosis* apresentou alta similaridade; *C. ulcerans* apresentou diversidade genética para o gene *pld*.

Fonte: Da autora, 2017.

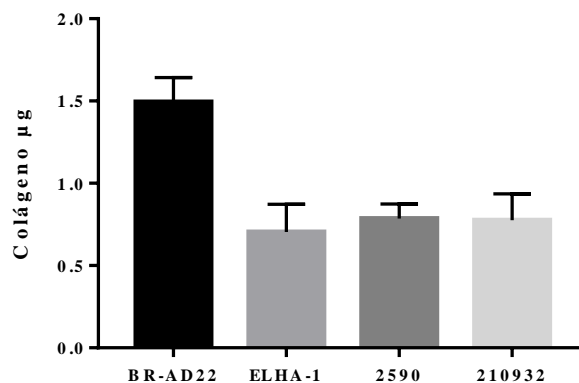
4.8 Avaliação da capacidade de interação bacteriana com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular de origem humana

Uma vez que previamente foi relatado pelo nosso grupo de pesquisa que *C. ulcerans* é capaz de interagir com proteínas plasmáticas e de ECM (SIMPSON-LOURÊDO *et al.*, 2014), no presente estudo foi investigada também a possível influência da expressão de PLD neste processo por meio da inclusão das amostras PLD-negativas ELHA-1e 2590. Os resultados

apresentados no **Gráfico 1, 2 e 3** indicaram que as amostras de *C. ulcerans* foram capazes de interagir com Fbg, Fn e colágeno Tipo I porém em intensidades variadas. A maior capacidade de interação com Fbg, Fn e colágeno Tipo I foi observada para a amostra selvagem PLD-positiva BR-AD22, seguida pela amostra 210932 toxigênica. A amostra mutante ELHA-1 teve a capacidade de interação com as proteínas significativamente reduzida quando comparada com a amostra selvagem BR-AD22.

As amostras 2590 PLD-negativa e 210932 PLD e TD-positivas mostraram resultados equivalentes para interação com o colágeno, porém a 210932 apresentou uma afinidade maior pela Fb. Entretanto, diferenças significativas foram encontradas entre a amostra 210932 e a amostra 2590 na interação com Fn ($p < 0,05$). As amostras ELHA-1 e 2590 PLD-negativas, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre si.

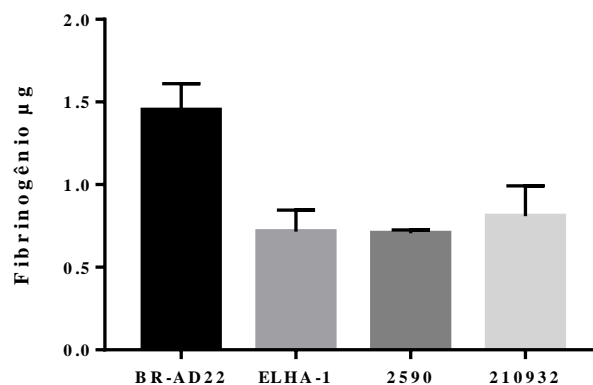
Gráfico 1 - Aderência das amostras de *C. ulcerans* ao colágeno Tipo I



Amostra BR-AD22 apresentou maior aderência. Sem diferença estatística significativa entre as amostras ELHA-1, 2590 e 210932.

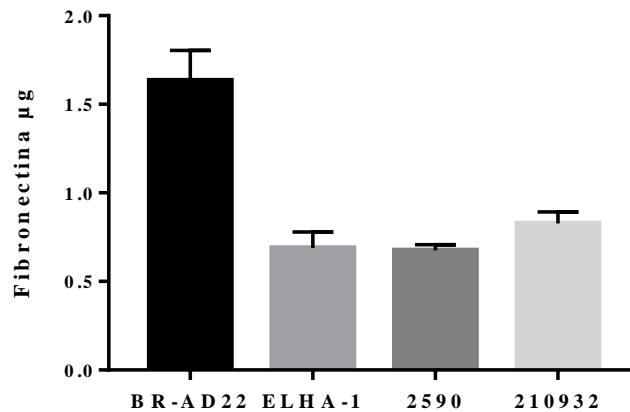
Fonte: (Da autora, 2016).

Gráfico 2 - Aderência das amostras de *C. ulcerans* ao fibrinogênio



Amostra BR-AD22 apresentou maior aderência. Não houve diferença estatística significativa entre as amostras ELHA-1, 2590 e 210932.

Fonte: (Da autora, 2016).

Gráfico 3 - Aderência das amostras de *C. ulcerans* a fibronectina

Amostra BR-AD22 foi apresentada maior aderência. Entre a amostra 210932 e 2590 foi encontrada diferença significativa pelo teste Anova.

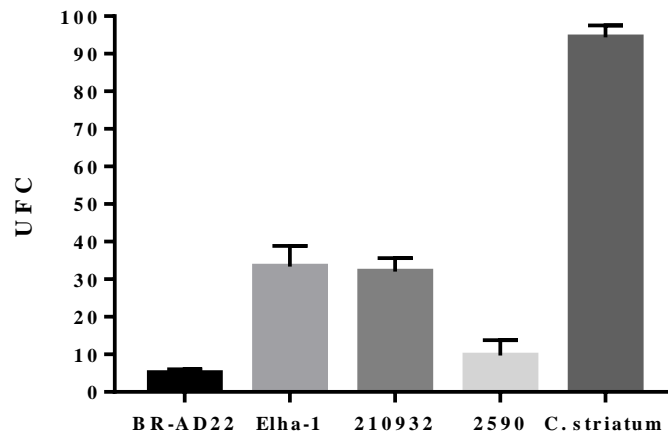
Fonte: (Da autora, 2016).

4.9 Análise quantitativa da capacidade de interação bacteriana com superfície abiótica

Análises prévias mostraram que *C. ulcerans* é capaz de interagir com superfície abiótica (placa de poliestireno) e induzir a formação de biofilme (dados não mostrados). Assim, de acordo com essa informação, foi feita a análise quantitativa de micro-organismos viáveis no biofilme formado sobre lamínulas de Thermanox[®] através da técnica de remoção mecânica das bactérias pelo uso de areia estéril.

Na análise estatística dos experimentos de interação pelo teste Anova foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias das amostras (**Gráfico 4**). Quando comparadas entre si, as amostras 2590 PLD-negativa e BR-AD22 não apresentaram diferença significativa; entre a amostra 2590 PLD-negativa e para as demais houve diferença significativa, independente da produção de TD e PLD, quando comparadas de forma pareada.

Gráfico 4 - Análise quantitativa de micro-organismos viáveis no biofilme



Fonte: (Da autora, 2018).

4.10 Ensaios moleculares relacionados à construção de mutante com cópia truncada para o gene *pld*

4.10.1 Análises em bioinformática

Para a construção da cepa mutante com gene *pld* de cópia truncada (**Tabela 8**) foram utilizados três pares de sequências de oligonucleotídeos desenhados *in silico* no programa *Clone Manager*, além de cepas de *E. coli* (*E. coli* DH5 α MCR e BL-21) e diferentes enzimas de restrição (*Sma*I e *Xma*I). Não foi obtido sucesso nessa construção.

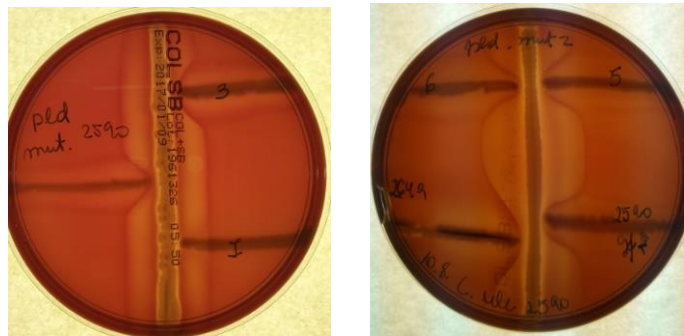
Tabela 8 - Sequências de oligonucleotídeos, enzimas de restrição e temperaturas empregadas para construção de *C. ulcerans* 2590 *pld*_mutante

Nome	Sequências de oligonucleotídeos	Enzima	T°C
<i>ld-XmaI-s</i>	5'-CGCG CCCGGGACCTGGCTCGATATTAAGAATCCTGA-3'	<i>Xma</i> I	58
<i>pld-XmaI-as</i>	5'-CGCG CCCGGGCCAAAGATCATTCCGTCTAC-3'	<i>Xma</i> I	58
<i>PLDmut_2590_XmaI-s</i>	5'-GCGCCCCGGGCGCGAATGCACTCGAAATTG-3'	<i>Xma</i> I	58
<i>PLDmut_2590_XmaI-as</i>	5'-GCGC CCCGGGGATCGCATGTCTTGTTCCTAGG-3'	<i>Xma</i> I	58
<i>PLD_mut2_2590-as</i>	5'-GCGC GGGCCCGTCTACGTGGGCTTTCCTAGG-3'	<i>Sma</i> I	60
<i>PLD_mut2_2590-s</i>	5'-GCGCCCCGGGTCTCTACTACCCAAGGCG-3'	<i>Sma</i> I	60

Fonte: (Da autora, 2017).

Embora o plasmídeo *pk18mob-pld* tenha se integrado ao cromossoma da amostra 2590, como foi verificado através do crescimento da amostra mutante em meio seletivo com canamicina 50 µg.mL⁻¹, o gene *pld* continuou sendo codificado e a PLD expressa, conforme resultado obtido no teste de CAMP pela inibição do halo de hemólise por *S. aureus* e formação do CAMP reverso (**Figura 5**).

Figura 5 - CAMP reverso da amostra 2590 *pld*-mutante

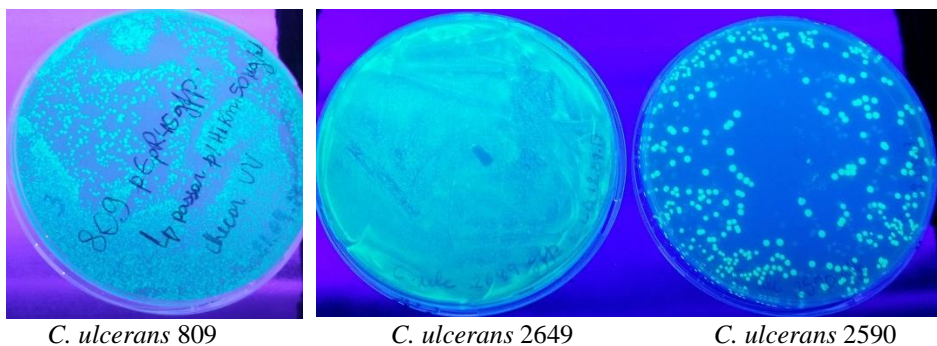


Fonte: (Da autora, 2017).

4.11 Clonagem das amostras de *C. ulcerans* com plasmídeos pXMJ19mcherry e pEPR1p45gfp

As amostras foram transformadas e expressaram seus marcadores, como se verificou na fluorescência sob luz ultra-violeta do plasmídeo pEPR1p45gfp (**Figura 6**) e na microscopia de fluorescência (*red fluo*) do plasmídeo pXMJ19mCherry (**Figura 7**).

Figura 6 - Amostras com plasmídeo pEPR1p45gfp

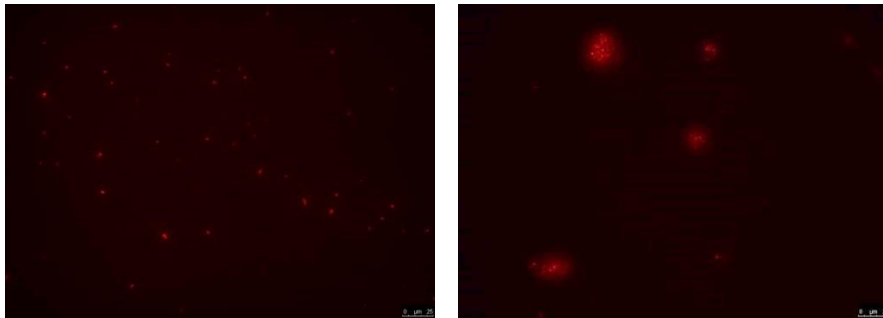


C. ulcerans 809
Fluorescência esverdeada sob luz UV.
Fonte: (Da autora, 2017).

C. ulcerans 2649

C. ulcerans 2590

Figura 7- Microscopia de fluorescência em amostras de *C. ulcerans* com plasmídeo pXMJ19*mCherry*



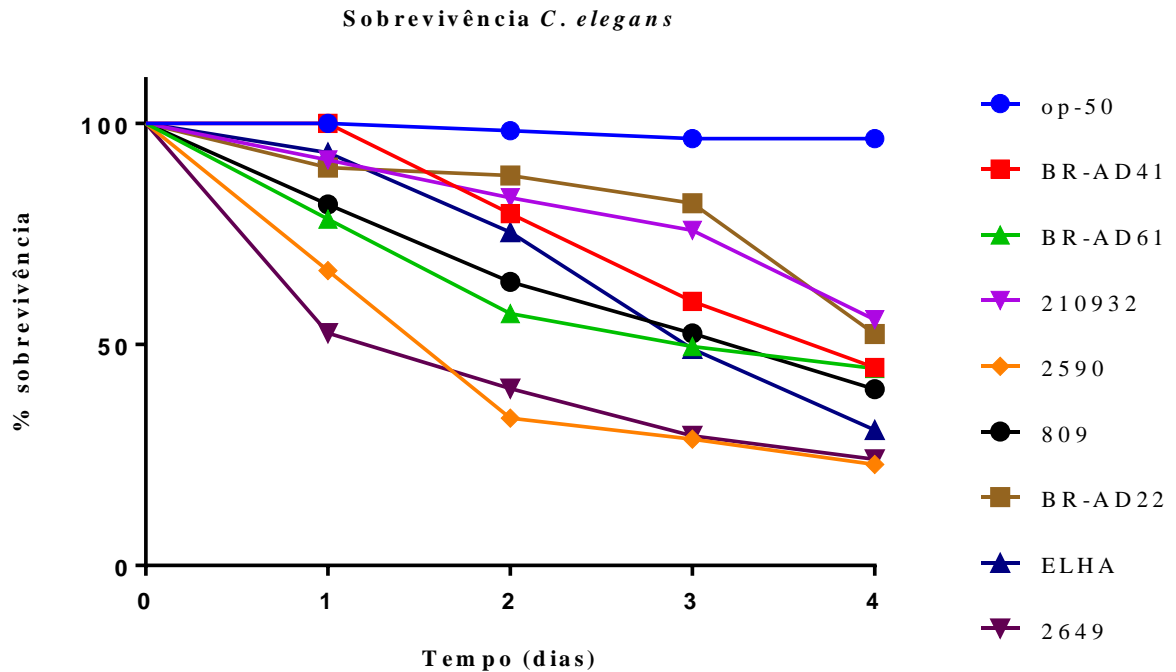
Fluorescência alaranjada em microscópio de fulorescência.
Fonte: (Da autora, 2017).

4.12 Análise através de modelo experimental *in vivo* da influência de PLD na mortalidade e alterações morfológicas de nematódeos *C. elegans*

Ensaio de sobrevivência do nematódeo *C. elegans* frente à infecção pelas bactérias foram realizados com todas as amostras de *C. ulcerans* e os resultados comparados no GraphPad Prisma 7.04 (**Gráfico 5**). Os vermes se mostraram mais sensíveis às amostras 2590 (TD e PLD negativa) e 2649 (TD negativa) seguida da amostra ELHA-1 (PLD negativa), sem diferença estatística entre elas ($p < 0,05$). Houve diferença significativa no p -valor entre as amostras 2590 e *E. coli* OP50. Entre as demais amostras, não foram observadas diferenças estatísticas significantes.

Adicionalmente, alterações morfológicas foram observadas em todas as amostras de *C. ulcerans*, como deformidade da região anal (DAR) e eclosão dos ovos ainda dentro dos vermes, com presença de larvas vivas (*bagging*), que são indicativos de capacidade de agressão e virulência da bactéria.

Além disso, ensaios de infecção foram realizados com os clones das amostras 2590, 2649 e 809 transformados com plasmídeo pXMJ19*mCherry* e analisados em microscopia de fluorescência (*red fluo*) com λ de excitação de 587 nm e emissão de 600-620 nm. Nas imagens foram observados os sítios do trato gastro-intestinal (TGI) onde as bactérias se aderiram e também é possível avaliar qual amostra mais aderiu conforme a intensidade da fluorescência. Nesse ensaio a amostra 2649 foi a que obteve melhor capacidade de interação/infecção, seguida da amostra 2590 com grau moderado. Por último, a amostra 809 apresentou menor grau de interação/infecção em *C. elegans*, após 24 h, como se vê nas **Figuras 8, 9 e 10**.

Gráfico 5 - Sobrevivência de *C. elegans* pós-infecção com *C. ulcerans*.

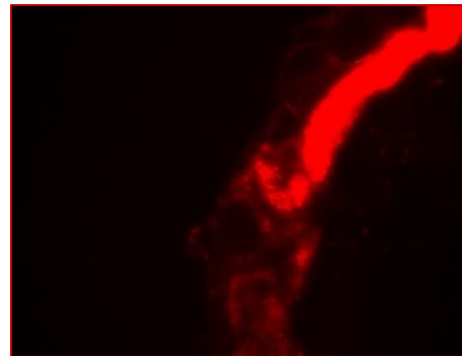
Fonte: (Da autora, 2015).

Figuras 8 A e B - Imagens de infecção por *C. ulcerans* 2649 pXMJ19mCherry em *C. elegans*

(A)



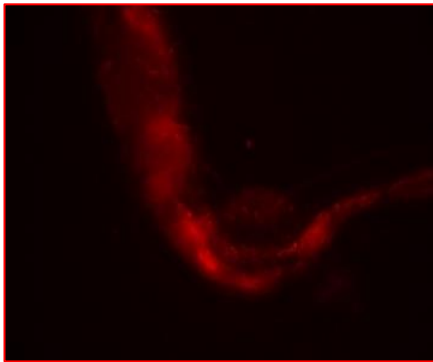
Aumento 100x: nematódeo inteiro
Superposição de imagem campo brilhante e
fluorescência.



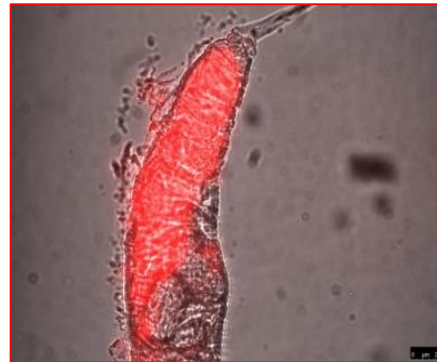
Aumento 400x: porção mediana e parte
do TGI.

As áreas em rosa indicam os locais de infecção das bactérias aderidas ao TGI, pela emissão de fluorescência.
Fonte: (Da autora, 2017).

Figura 8 - Imagem de infecção por *C. ulcerans* 2649 pXMJ19mCherry em *C. elegans*
(B)



(B)Aumento 400x: porção mediana e parte do TGI, somente fluorescência.



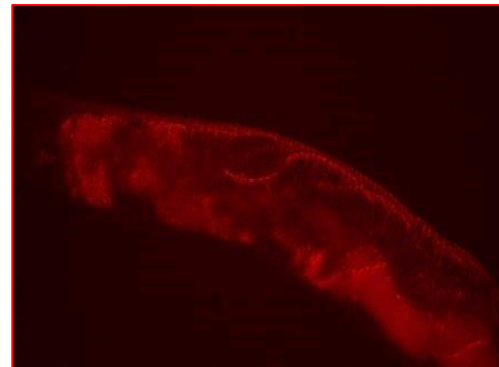
Aumento 400x: porção final do TGI, superposição de imagem campo brilhante e fluorescência.

As áreas em rosa indicam os locais de infecção das bactérias aderidas ao TGI, pela emissão de fluorescência.
Fonte: (Da autora, 2017).

Figura 9 - Imagem de infecção por *C. ulcerans* 2590 pXMJ19mCherry em *C. elegans*.



Aumento 400x, superposição de imagens: porção mediana, TGI em rosa e ovos eclodidos e larvas (*bagging*)



Aumento 400X : somente fluorescência, mesma imagem

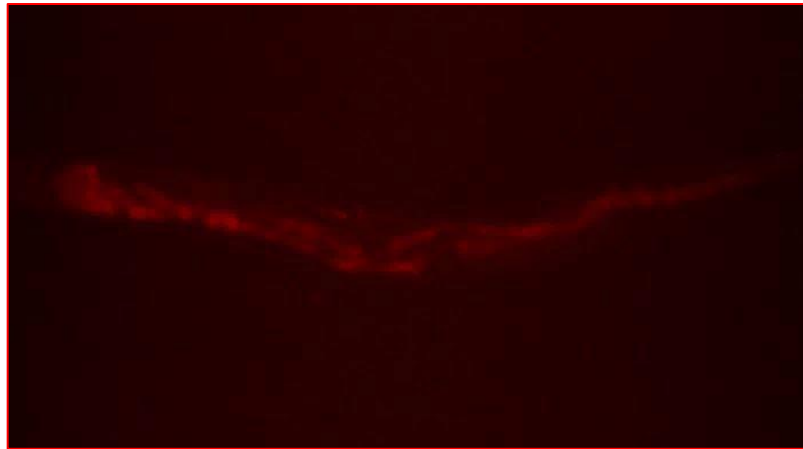
As áreas em rosa indicam os locais de infecção das bactérias aderidas ao TGI, pela emissão de fluorescência.
Fonte: (Da autora, 2017).

Figuras 10 A e B - Imagem de infecção por *C. ulcerans* 809 pXMJ19mCherry em *C. elegans*
(A)



Aumento 400x: nematódeo inteiro, TGI em rosa e *bagging* .
Fonte: (Da autora, 2017).

(B)



Aumento 400x: mesma imagem, somente fluorescência.
Fonte: (Da autora, 2017).









4.13 Avaliação do potencial de virulência pelo modelo experimental *in vivo* em lagartas de *G. mellonella*

Os resultados (**Tabela 9**) da avaliação de virulência no modelo biológico *G. mellonella* foram demonstrados pela melanização da lagarta em resposta à infecção, que se tornou escura, variando do cinza/castanho ao negro, além da diminuição da atividade e de reação das larvas, no tempo avaliado (OTT *et al.*, 2012).

No teste em questão, amostras de *C. ulcerans* foram capazes de levar a óbito diferentes números de lagartas. As amostras PLD-positivas e TD-negativas 809 e 2649 de *C. ulcerans* causaram a morte do número total de lagartas testadas (n= 5), seguidas da amostra PLD-positiva BR-AD22 (n= 3) e da amostra 210932 PLD e TD-positivas (n= 1).

As amostras PLD-negativa 2590 e ELHA-1 não levaram a óbito nenhuma lagarta, porém houve uma discreta melanização das lagartas. Da mesma forma, não ocorreu óbito de lagartas injetadas com *C. glutamicum* e *C. diphtheriae* (*tox+*), além do tampão MgSO₄ utilizado nos experimentos.

Tabela 9 - Número de óbitos e melanização de lagartas de *G. mellonella* 7 dias pós-infecção*

Amostra/ Produção de toxinas	Óbitos	Melanização	Amostra/ Produção de toxinas	Sem óbito	Melanização
<i>C. ulcerans</i> 809 PLD+, <i>tox</i> -	5		<i>C. ulcerans</i> 2590 PLD-, <i>tox</i> -	0	
<i>C. ulcerans</i> 2649 PLD+, <i>tox</i> -	5		<i>C. ulcerans</i> ELHA-1 PLD-, <i>tox</i> -	0	
<i>C. ulcerans</i> BR-AD22 PLD+, <i>tox</i> -	3		<i>C. glutamicum</i> PLD-, <i>tox</i> -	0	
<i>C. ulcerans</i> 210932 PLD+, <i>tox</i> +	1		<i>C. diphtheriae</i> 200 PLD-, <i>tox</i> +	0	

*(n inicial= 5 lagartas); +, positiva; -, negativa.
Fonte: (Da autora, 2019).

4.14 Avaliação do perfil hematológico e indução de lesão cutânea de murinos pós-infectados com *C. ulcerans*

Uma vez que o número de camundongos disponíveis para a realização do experimento era estrito, foram selecionadas amostras que fossem representativas quanto às toxinas expressas (TD e PLD) e estão descritas na **Tabela 10**, assim como as alterações que ocorreram nos valores do hemograma (SANTOS *et al.*, 2016).

Tabela 10 - Contagem de células sanguíneas em hemograma de camundongos pós-infecção.

Amostra TD/PLD	LG/ μ L	Hm x $10^6/\mu$ L	Plaq x $10^6/\mu$ L	Seg	Linfo	Mono	Baso	Eosino
210932 +/+	13.100	8,78	1.197.000	7.336	32	12	0	0
210932 +/+	10.800	4,65	588.000	1.620	79	4	0	1
BR-AD22 -/+	18.700	6,9	65.000	8.041	47	10	0	0
BR-AD22 -/+	13.100	6,13	542.000	7.336	44	0	0	0
BR-AD22 -/+	9.900	5,74	719.000	2.270	73	2	0	2
2590 -/-	12.600	7,29	883.000	2.268	82	0	0	1
2590 -/-	8.600	7,29	1.074.000	1.462	79	2	0	2
2590 -/-	6.100	8,46	1.262.000	976	77	5	0	2
Elha1 -/-	10.000	9,13	1.411.000	2.300	71	4	0	2
Elha1 -/-	7.400	7,07	961.000	592	90	2	0	0
Elha1 -/-	9.400	6,75	944.000	752	90	1	0	1
Controle -	8.700	7,52	825.000	1.044	87	0	0	1
Controle -	10.000	8,58	837.000	1.600	79	5	0	1

TD: toxina difteria; PLD: fosfolipase D; LG: leucometria global; Hm: hemácias; Seg: neutrófilo segmentado; Linfo: linfócito; Mono: monócito; Baso: basófilo; Eosino: eosinófilo.

Fonte: (Da autora, 2017).

O número de óbitos registrado foi igual a um ($n= 1$), 48 h após a infecção de camundongo com a amostra 210932 TD e PLD-positivas. Mudança significativa na proporção entre o número total e relativo de células vermelhas (hemácias) e redução de 50% na percentagem de hemoglobina foram igualmente observadas para a mesma amostra.

Empilhamento de hemácias, com formação de *rouleaux* eritrocitário, característico em quadros de inflamação, foi encontrado em todas as amostras testadas, com exceção da ELHA1-*pld* mutante (**Figura 11**). Anisocitose com normocitose foram observadas nas amostras 210932, BR-AD22 e ELHA1-*pld* mutante. Leucocitose foi observada independente da produção de TD ou PLD. Formação de neutrófilo tóxico (**Figura 12**) encontrado em casos de inflamação severa ou infecção bacteriana (sepsis), embora raro em camundongos, foi observada na amostra

201932. Agregação plaquetária foi encontrada em diferentes níveis para todas as amostras testadas, independente da produção de TD e PLD (**Figura 13**).

O sangue coletado de um animal controle coagulou durante a coleta e por isso foi descartado da contagem de células sanguíneas.

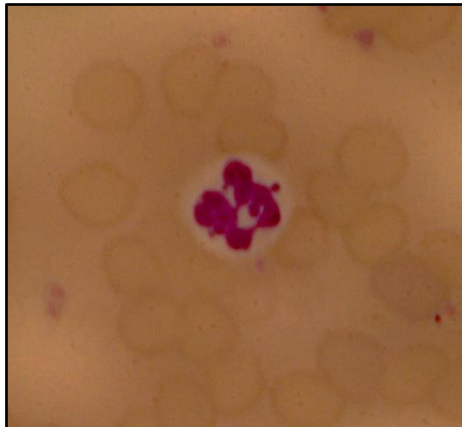
Figura 11- Rouleaux eritrocitário (empilhamento de hemácias - “hemácias em moedas”)

C. ulcerans 210932.



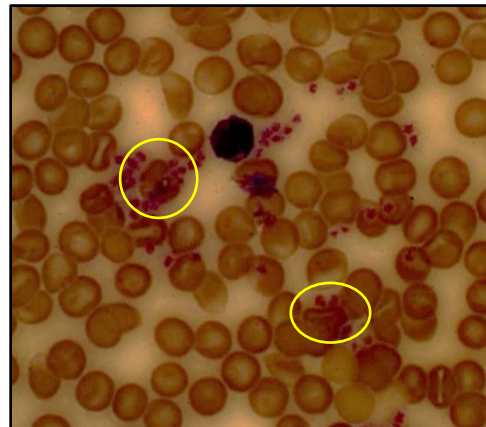
Fonte: (Da autora, 2016).

Figura 12 - Neutrófilo tóxico



Neutrófilo tóxico por amostra 210932
Aumento: 100x
Fonte: (Da autora, 2016).

Figura 13 - Agregação plaquetária



Aumento: 100x
Fonte: (Da autora, 2016).

Alterações cutâneas, com reação local inflamatória e formação de úlceras foram observadas para todos os animais que foram infectados com as amostras PLD-positivas BR-AD22 (TD-negativa) e 210932 (TD-positiva) (**Figuras 14 A e B**). As amostras TD e PLD-

negativas 2590 e ELHA-1 *pld*-mutante não causaram alteração no local da inoculação (**Figuras 15 A e B**), assim como o controle negativo (**Figura 15 C**).

Mudanças de comportamento (pelos eriçados, alteração de postura e diminuição de atividade) não foram observadas nos animais testados durante o período do experimento.

Figuras 14 A e B - Lesão no local de inoculação de suspensão bacteriana de *C. ulcerans* em cauda de camundongo Swiss-Webster

(A)



Amostra BR-AD22 PLD+ TD-

Fonte: (Da autora, 2016).

(B)



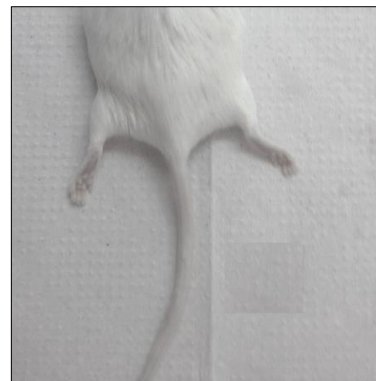
Amostra 210932, PLD+ e TD +

Figura 15-Ausência de lesão no local de inoculação de *C. ulcerans* em cauda de camundongo Swiss-Webster

(A)

(A) amostra 2590 PLD e TD-negativa; (B) amostra ELHA-1 *pld* mutante e TD-negativa; (C) controle negativo.
Fonte: (Da autora, 2016).

(B)



(C)

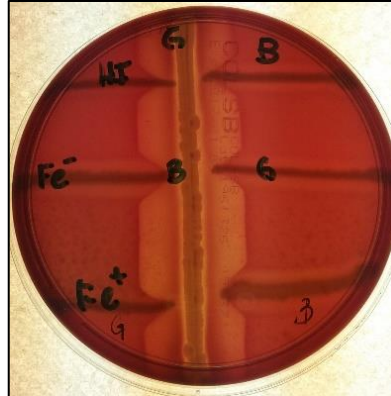


4.15 Influência de concentrações de ferro na expressão de fosfolipase D

O crescimento das bactérias em meio HI contendo diferentes concentrações de ferro e a sua influência na atividade fosfolipásica de amostras de *C. ulcerans* foi avaliada em teste CAMP (**Figuras 16, 17 e 18**).

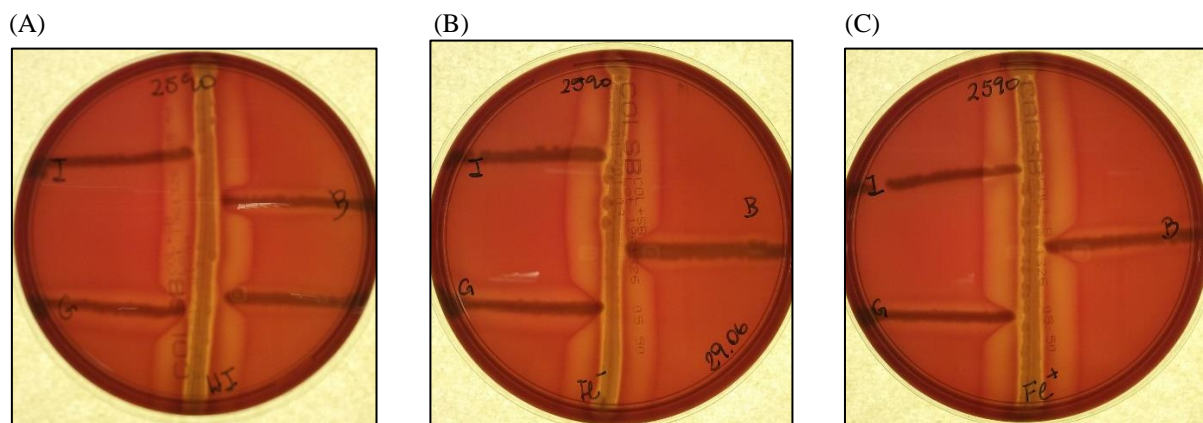
Não houve alteração na formação de CAMP-reverso de todas as amostras nas diferentes condições testadas; observou-se uma pequena diminuição do halo formado pela amostra 210932 TD positiva, quando crescida em meio com depleção de ferro.

Figura 16 - CAMP-reverso da amostra 809



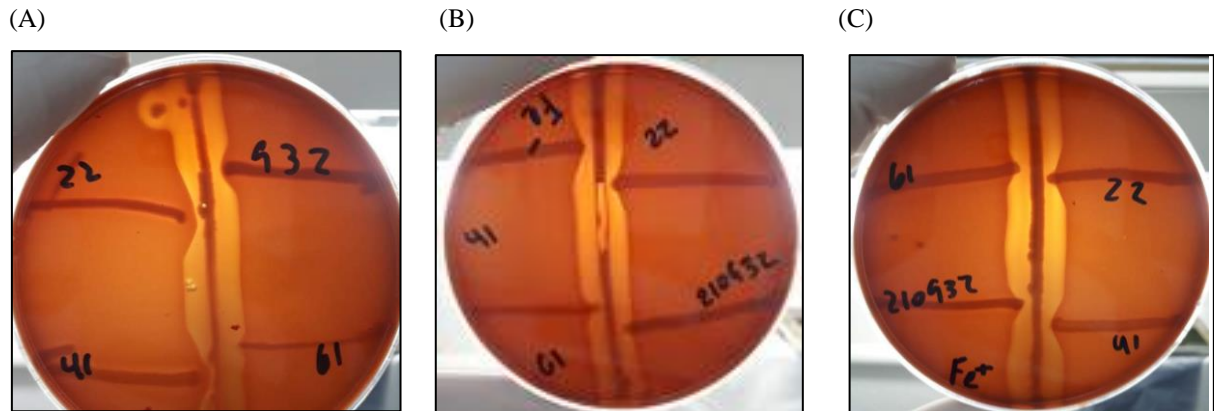
Fe-: meio com depleção de Fe; Fe+: meio com adição de Fe; HI: meio puro. B: Brasil; G: Alemanha
Fonte: (Da autora, 2017).

Figura 17 – CAMP-reverso da amostra 2590.



(A) HI, meio puro; (B) Fe-, meio com depleção de Fe; (C) Fe+: meio com adição de Fe; B: Brasil; G: Alemanha
Fonte: (Da autora, 2017).

Figura 18 – CAMP-reverso das amostras BR-AD22, BR-AD41, BR-AD61 e 210932.



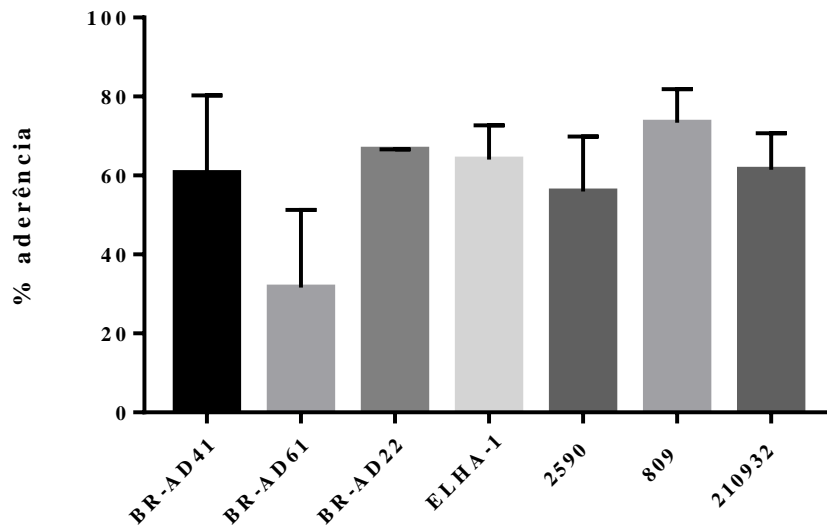
(A) HI, meio puro; (B) Fe⁻, meio com depleção de Fe; (C) Fe⁺: meio com adição de Fe; B: Brasil; G: Alemanha
Fonte: (Da autora, 2018).

4.16 Pesquisa da capacidade de interação bacteriana com macrófagos humanos e células HeLa

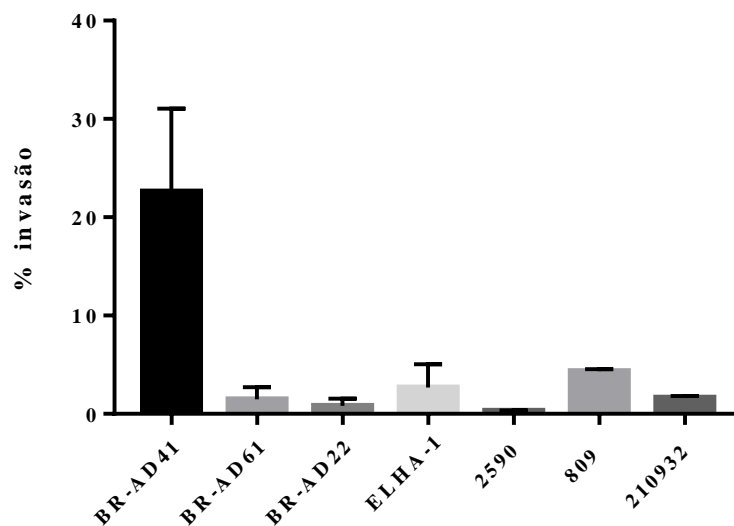
4.16.1 Interação bacteriana com macrófagos U-937

Todas as amostras avaliadas de *C. ulcerans*, independente da origem, foram capazes de interagir com macrófagos humanos em graus variados, mostrando sua capacidade em aderir à superfície celular (**Gráfico 6**). A amostra 809 de origem humana exibiu maior capacidade em aderir; as amostras 210932 TD positiva de origem humana e BR-AD22 TD negativa de origem animal apresentaram níveis próximos de aderência. Não houve diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$), segundo teste Anova, porém houve diferença estatística significativa entre a amostra BR-AD61 e as amostras BR-AD22 e 210932, segundo análise comparativa.

De maneira semelhante, as amostras de *C. ulcerans* foram internalizadas e capazes de sobreviver no interior de macrófagos em intensidades variadas (**Gráfico 7**). A amostra de origem animal BR-AD41 foi a que exibiu maior taxa de sobrevivência citoplasmática; as outras amostras, independente da presença do gene *tox* ou produção de fosfolipase exibiram níveis similares de sobrevivência intracelular em macrófagos U-937. Houve diferença significativa entre as médias das amostras ($p < 0,05$) segundo o teste Anova e entre a amostra 2590 e amostra 210932, segundo o teste T.

Gráfico 6 - Aderência a macrófagos por amostras de *C. ulcerans*

Aderência das amostras em graus distintos, sem diferença estatística significativa (Anova).
Fonte: (Da autora, 2015).

Gráfico 7 - Invasão de macrófagos por amostras de *C. ulcerans* em graus distintos, houve diferença estatística significativa entre as médias (Anova).

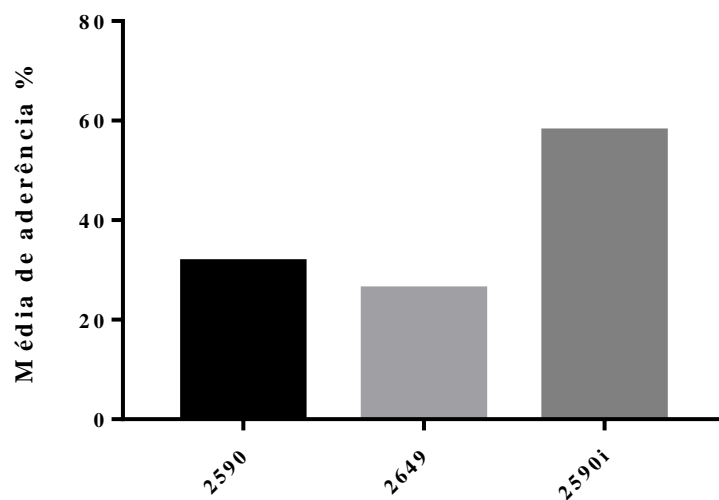
As amostras exibiram diferença estatística significativa entre as médias (Anova), em experimentos de invasão.
Fonte: (Da autora, 2015).

4.16.2 Interação com células HeLa

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência de *C. ulcerans*, experimentos quantitativos de adesão e invasão foram realizados em células HeLa com as

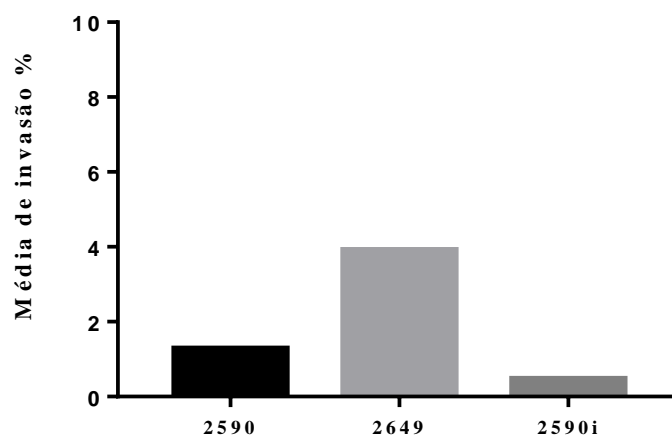
amostras 2590, 290i e 2649. A amostra 2590i foi anotada durante os experimentos na instituição alemã FAU, quando a 2590 original passou a exibir alteração no teste CAMP. As amostras mostraram capacidade de aderir e invadir, porém em níveis diferentes. A amostra 2590i, sem expressão da PLD (sem CAMP reverso), foi a que mais aderiu, porém apresentou o menor grau de invasão. A amostra 2649 foi a que mais invadiu, superando em até 6 vezes a amostra 2590 em invasão (**Gráficos 8 e 9**).

Gráfico 8 - Aderência em células HeLa por amostras de *C. ulcerans*.



A amostra 2590i (sem expressão de PLD) apresentou maior capacidade de aderência.
Fonte: (Da autora, 2017).

Gráfico 9 - Invasão em células HeLa por amostras de *C. ulcerans*.



Amostra 2649 apresentou maior capacidade de invasão em células HeLa.
Fonte: (Da autora, 2017).

5 DISCUSSÃO

A difteria é uma doença infectocontagiosa de evolução aguda e imunoprevenível. A vacina é composta pelo toxóide diftérico e a imunidade conferida decresce com a idade. Por somente neutralizar a TD, mas não atingir o patógeno, a vacina em suas várias combinações não elimina a infecção e o estado de portador assintomático (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2011).

Atualmente, nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, o número dos casos de difteria vem aumentando. *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* toxinogênicos podem produzir doença com risco de vida que requer tratamento urgente com antitoxina diftérica (DAT) mesmo sem a confirmação laboratorial. Casos de difteria com quadros clínicos atípicos, com infecções invasivas e ausência de pseudomembranas por amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae* têm sido descritos em maior frequência. Além disso, a difteria vem sendo relatada em indivíduos parcial ou totalmente vacinados, com ocorrência de surtos epidêmicos, inclusive no Brasil (DIAS *et al.*, 2011a; HACKER *et al.*, 2016; SEKAR *et al.*, 2017).

Infecções no homem por *C. ulcerans* eram raras e tradicionalmente limitadas a população rural em contato com animais de criação ou ao consumo de leite cru ou derivados não pasteurizados. Entretanto, durante a última década, infecções por *C. ulcerans* no homem, como difteria, fascite necrosante e lesões ulceradas em pele vêm aumentando em vários países e com frequência são relacionadas a transmissão zoonótica (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008; MEINEL *et al.*, 2014, 2015). Na Europa e Japão, o relato de casos de difteria por *C. ulcerans* ultrapassa o número de casos por *C. diphtheriae* (WAGNER *et al.*, 2012; SEKIZUKA *et al.*, 2012; HACKER *et al.*, 2016a; SEKAR *et al.*, 2017).

No Brasil, em 2008, foi descrito um caso de infecção fatal por *C. ulcerans* em paciente humano, por amostra atoxinogênica (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008). Nessa ocasião, o paciente era residente na zona sul da cidade do Rio de Janeiro e não houve ligação da possível fonte de infecção com animais. Adicionalmente, em 2010 e 2014, foram isoladas amostras atoxinogênicas em cães assintomáticos na região metropolitana do Rio de Janeiro (DIAS *et al.*, 2010; SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2014).

Em 2015, no estado de Pernambuco, foram relatados casos de difteria tanto por *C. diphtheriae* como por *C. ulcerans*. Embora houvesse um relato anterior de co-infecção por *C. diphtheriae* e mononucleose infecciosa (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2011), nesse estudo foi identificado o primeiro caso de difteria por *C. ulcerans* não produtor de TD em co-infecção com mononucleose infecciosa (SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2019). O paciente apresentou

quadro de difteria clássica, embora fosse considerado imunizado, o que reforça a mudança no perfil epidemiológico da doença e a necessidade de rotina laboratorial para difteria, como observado previamente por outros autores (DIAS *et al.*, 2011a; SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2014).

Na mesma localidade, outra paciente apresentou quadro de faringite, com suspeita inicial de difteria. O diagnóstico não se confirmou, porém foram isoladas duas amostras de *C. ulcerans* não produtoras de TD em cães que tinham convívio com a paciente. A localidade em Pernambuco de onde foram isoladas as amostras de *C. ulcerans* é um município pequeno, da área rural, onde o convívio com animais e o consumo de produtos lácteos *in natura* ou sem fiscalização sanitária é comum. Este dado reforça o fato de que, na sua origem, a infecção por *C. ulcerans* pode ocorrer por contato frequente com gado leiteiro ou pela ingestão de seus derivados (DIAS *et al.*, 2011a; MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011; HACKER *et al.*, 2016a).

Pesavento (2007) discutiu sobre fatores de virulência se expressarem em decorrência da pressão seletiva associada a condições socioeconômicas como densidade demográfica e condições higiênico-sanitárias deficientes, aliadas ao convívio íntimo com animais.

Mesmo com o isolamento de amostras em animais de companhia, em nosso país há poucos relatos de amostras de *C. ulcerans*, o que levanta a questão que não há preocupação e nem conhecimento diagnóstico dos profissionais da área da saúde para esse patógeno, a despeito da Nota Técnica Nº 25.000.140.269/2010-39 do Ministério da Saúde que alerta sobre a difteria. É provável que os profissionais não saibam isolar o microrganismo e nem reconhecer um quadro clínico quando ele se apresenta. Os testes de triagem e fenotípicos demandam tempo e preparo técnico e na maioria das vezes bastonetes Gram-positivos irregulares são descartados como contaminantes. Na Inglaterra e França foram relatados vários casos, porém são países que têm um programa de prevenção, diagnóstico e tratamento bem estabelecido (WAGNER *et al.*, 2012).

O tratamento e antibioticoterapia de doença diftérica causada por *C. ulcerans* deve seguir as orientações clínicas para pacientes infectados com *C. diphtheriae*. Um antibiótico apropriado (penicilina ou eritromicina) deve ser usado para eliminar o agente causal, interromper a produção de exotoxina e reduzir a comunicabilidade (WAGNER *et al.*, 2010; MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2011; SEKIZUKA *et al.*, 2012; CDC, 2018). Entretanto, em nosso estudo, as amostras de *C. ulcerans* independente da produção de PLD apresentaram perfis distintos quanto à sensibilidade à penicilina. Quando o método utilizado para avaliar foi o CLSI, a maioria apresentou sensibilidade intermediária ou resistência, com exceção da mutante

ELHA-1, 2649 e 210932. A amostra 2590 isolada do caso clínico apresentou resistência à penicilina tanto pelo CLSI como pelo EUCAST-BrCAST, o que justifica o paciente não ter respondido ao tratamento inicial.

Clindamicina é considerada como uma alternativa no tratamento de portadores de bacilos diftéricos, especialmente naqueles casos resistentes à penicilina (ZAMIRI; McENTEGAR, 1972). Porém, em nosso estudo, as amostras de *C. ulcerans* mostraram susceptibilidade intermediária ou resistência a clindamicina, de maneira semelhante a estudo realizado no Japão em amostras coletadas de cães (KATSUKAWA *et al.*, 2012). A amostra 2649 foi a única que apresentou sensibilidade a clindamicina por ambos os protocolos. Dessa forma, os dados sugerem que deva existir grande preocupação em relação ao uso de antibióticos classicamente recomendados para casos de infecção por *C. diphtheriae* bem como para *C. ulcerans*; e que a realização de teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos deve ser considerada sempre que houver suspeita de difteria.

Testes fenotípicos demandam tempo e conhecimento da técnica e somente eles não são capazes de identificação inequívoca de *C. ulcerans*, passíveis de apresentar resultados atípicos. Um dos testes de diagnóstico essencial na triagem de corinebactérias suspeitas em caso de difteria é o teste CAMP (SOUČKOVÁ; SOUČEK, 1972; DIAS *et al.*, 2011a). Amostras de *C. ulcerans* são consideradas CAMP reverso, porém a amostra isolada nesse estudo não apresentou sua formação. Outro método comum usado na triagem laboratorial é o API-Coryne (DIAS *et al.*, 2011a; HACKER *et al.*, 2016a), que nem sempre consegue fornecer a uma identificação conclusiva das espécies bacterianas, necessitando de provas auxiliares para confirmação, o que demanda tempo e conhecimento (ALIBI *et al.*, 2015), como foi observado nesse estudo para a amostra 2590, não identificada como *C. ulcerans* pelo método citado.

Uma técnica fenotípica moderna de diagnóstico, como MALDI-TOF MS, tem sido utilizada com maior frequência na triagem laboratorial, com bons resultados, trazendo rapidez, menor manipulação da amostra a um custo efetivo mais baixo. Corinebactérias podem facilmente ser identificadas em 15 min por MALDI-TOF MS; a desvantagem é que não são identificadas amostras produtoras de TD (SEKAR *et al.*, 2017). A segurança do teste é outro fator importante, Konrad *et al.* (2010) identificaram corretamente 100% de 90 amostras de corinebactérias isoladas em um levantamento epidemiológico realizado em hospital. Entretanto, em estudos mais recentes, 76,9% das amostras não foram identificadas ao nível de espécie pelo técnica de MALDI-TOF MS, somente ao nível de gênero *Corynebacterium* spp (ALIBI *et al.*, 2015), como observado por esse estudo em duas amostras de *C. ulcerans* (2590 e 2649).

Com base nessa questão, a identificação de espécies de corinebactérias somente é alcançada quando são utilizadas técnicas genotípicas, como PCR, sequenciamento de genes *housekeeping* (16S *rRNA* e *rpoB*) e sequenciamento parcial ou completo de genomas (HACKER *et al.*, 2016a; SEKAR *et al.*, 2017). A técnica de mPCR, onde são utilizados cinco pares de oligonucleotídeos é capaz de identificar as três espécies de corinebactérias potencialmente produtoras de TD e é muito empregada na rotina laboratorial em casos de suspeita de difteria (TORRES *et al.*, 2013; SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2014). No estudo em questão, a mPCR conseguiu identificar todas as amostras de *C. ulcerans*, incluindo a produção de TD.

O desenvolvimento de sequenciamento de DNA de alto rendimento proporcionou oportunidades para a pesquisa de genomas. A aplicação dessas novas tecnologias resultou em descrições detalhadas sobre a arquitetura do genoma e o conteúdo genético comum e específico das espécies de *Corynebacterium*, proporcionando sua identificação inequívoca (VENTURA *et al.*, 2007; TROST *et al.*, 2011; BURKOVSI, 2013; HACKER *et al.*, 2016a). As amostras isoladas na localidade de Pernambuco foram encaminhadas para o sequenciamento, uma vez que o MALDI-TOF MS não as identificou a nível de espécie. Embora pela técnica de mPCR elas tenham sido identificadas, o comportamento atípico da amostra 2590 tornou necessário uma identificação a nível de genoma.

C. ulcerans e *C. pseudotuberculosis* são as únicas corinebactérias que produzem PLD, compartilhando alta similaridade genética e ocupando o mesmo ramo filogenético em árvore construída pelo alinhamento do gene *rpoB* (KHAMIS, RAOULT; SCOLA, 2004; DORELLA *et al.*, 2006). Ao lado da TD, a PLD é considerada o principal fator de virulência de *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*. Em contraste com a TD, o gene *pld* está presente no cromossoma de todas as amostras de *C. ulcerans* (HACKER *et al.*, 2016a). Amostras de *C. ulcerans* produtoras de PLD, mas não da TD, são capazes de causar doença severa no homem, como linfadenites, dermatites, abscessos cutâneos, faringite aguda e infecções no trato respiratório inferior (pneumonia e nódulos granulomatosos em tecido pulmonar) (DESSEAU *et al.*, 1995; HOMMEZ *et al.*, 1999; HATANAKA *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2011a). Consequentemente, amostras de *C. ulcerans* não produtoras de TD não devem ser subestimadas. PLD pode causar um aumento na permeabilidade vascular, tem propriedades dermonecroticas, reduz a viabilidade de neutrófilos e macrófagos e pode causar agregação plaquetária com formação de trombos intravenosos em animais de laboratório (SOUČKOVÁ; SOUČEK, 1972; SCHMIEL; MILLER, 1999; DIAS *et al.*, 2011a).

Embora a produção de PLD não tenha sido demonstrada pela inibição de hemólise no teste CAMP, a amplificação da sequência gênica de *pld* da amostra 2590 pela PCR foi demonstrada. Adicionalmente, o alinhamento das sequências de genes *pld* das espécies *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* e construção da árvore filogenética permitiu observar que *C. pseudotuberculosis* mostrou uma alta similaridade entre as sequências, ocupando um único ramo e uma grande diversidade entre as sequências de nucleotídeos de *C. ulcerans*. A heterogeneidade do gene *pld* de *C. ulcerans* pode sugerir o comportamento atípico da amostra 2590, uma vez que rearranjos no genoma bacteriano, como inativação ou perda de genes são particularmente observados em vários gêneros bacterianos cujo meio de vida está ligado a adaptação a diversos hospedeiros e nichos ecológicos que proporcionam muitos intermediários metabólicos (VENTURA *et al.*, 2007, TAUCH; BURKOVSKI, 2015).

O sequenciamento de genoma e genes e os ensaios moleculares com construção de mutantes são ferramentas valiosas para melhor compreensão dos genes envolvidos na virulência (GREEN; SAMBROOK, 2012; TROST *et al.*, 2011). Entretanto, em determinadas amostras de uma mesma espécie a construção de mutantes não foi bem-sucedida, como observado para amostra 809 de *C. ulcerans* (HACKER *et al.*, 2015).

Sinais clínicos de difteria demonstrados pela amostra de *C. ulcerans* 2590 incluíram a presença de uma membrana branco acinzentada, "pescoço de touro" e sinais de toxicidade sistêmica. O fato de sinais de difteria clássica estarem presentes em quadro de infecção por amostra de *C. ulcerans* TD e PLD-negativas aponta para a participação de outros fatores envolvidos nos mecanismos da virulência e que necessitam de estudos adicionais. Ainda, em razão do aumento do número e da severidade dos casos de infecções em indivíduos parcial ou totalmente imunizados, esses mecanismos vêm sendo objeto de estudos mais detalhado. Pesquisas prévias demonstraram a existência de um conjunto de fatores de virulência presentes em amostras de *C. ulcerans*, além da TD e exotoxina PLD, tais como: catalase, proteases, deoxiribonuclease (DNase), neuraminidase H (NanH), endoglicosidase E (EndoE) e subunidades de pili adesivos do tipo SpaBDEF (TROST *et al.*, 2011; BURKOVSKI, 2013; HACKER *et al.*, 2016a).

Nesse sentido, amostras de *C. ulcerans* apresentaram potencial de toxigenicidade em experimentos *in vivo*, como demonstrado anteriormente em experimentos em animais de laboratório e pela formação da úlcera com depósito de fibrina em pacientes (SOUČKOVÁ; SOUČEK, 1972; MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2011b). Amostras de *C. ulcerans* possuíram atividade artrítogênica amostra-dependente, não relacionada à produção de catalase, DNase e TD e demonstraram um maior potencial artrítogênico e de mortalidade

quando comparadas com amostras de *C. diphtheriae* durante infecção experimental *in vivo* em camundongos (DIAS et al, 2011b).

Estudo anterior avaliou modelo de infecção intranasal por *C. ulcerans* em camundongos, onde o patógeno foi recuperado de trato respiratório superior, circulação periférica e disseminado para pulmões, fígado e rins, caracterizando infecção sistêmica (MOCHIZUKI *et al.*, 2015). Outro estudo comprovou a atividade fosfolipásica em ensaios utilizando sangue de caprinos, com alterações detectadas em contagem de hemácias, volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina, entre outros (MAHMOOD *et al.*, 2016). Em nosso estudo, a infecção por via corrente sanguínea foi capaz de causar alterações no perfil hematológico murino em graus variados. Formação de *rouleaux* eritrocitário, indicador de inflamação pela hiperfibrinogenemia e hiperglobulinemia (SCHALM, 2001) foram observadas para todas as amostras, exceto para a mutante ELHA-1. Leucocitose, que da mesma forma é observada na resposta inflamatória, foi detectada durante a infecção, independente da produção de TD ou PLD pelas amostras de *C. ulcerans*. Entretanto, a resposta à infecção por inoculação na pele teve resultados distintos, sendo nítida a influência de PLD na formação de lesões/úlceras. A amostra 2590 PLD negativa como a mutante ELHA-1 não foram capazes de induzir lesões.

Modelos de animais invertebrados vêm sendo empregados em estudos de interação patógeno-hospedeiro com bactérias diversas (JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; OTT *et al.*, 2012). Entre eles se destaca o nematódeo *C. elegans* como esquema de avaliação fácil e rápida da virulência e frequentemente servindo como exemplo de rota de infecção oral de patógenos humanos e animais como *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* (OTT *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015b). Em ensaio realizado por Ott *et al.* (2012), não foi observada diferença entre as percentagens de sobrevivência dos nematódeos quando infectados pela amostra selvagem BR-AD22 produtora de PLD e sua mutante com cópia truncada ELHA-1, porém, diferenças foram detectadas quando avaliadas entre as espécies de corinebactérias. O sítio de colonização das diferentes espécies de corinebactérias também foi observado, com *C. diphtheriae* ocupando a faringe e TGI anterior, *C. ulcerans* 809 ocupando o TGI médio e BR-AD22 dispersa por todo o corpo.

Entretanto, em nosso estudo, a sobrevivência de *C. elegans* em resposta à infecção por amostras de *C. ulcerans* foi observada em diferentes níveis. A influência de expressão de PLD nesse modelo foi determinante, uma vez que amostras que não expressavam PLD (2590 e ELHA-1) levaram a óbito maior percentagem de vermes, enquanto amostras PLD-positivas exibiram menor capacidade de morte de nematódeos, independente da produção de TD. Entretanto, outros fatores de virulência podem estar envolvidos e levando A construção de

clones de amostras de *C. ulcerans* com plasmídeos de fluorescência mCherry permitiu a visualização da colonização/infecção em TGI e vulva dos nematódeos com a formação de DAR.

Outro exemplo de invertebrado que vem sendo empregado em estudos de interação patógeno-hospedeiro é a lagarta de *G. mellonella*, que possui um sistema imune mais complexo (OTT *et al.*, 2012). Ensaio anterior mostrou diferenças entre as corinebactérias *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, que induziram efeitos mais severos do que *C. diphtheriae*. Foi observada diminuição drástica das alterações quando comparadas amostra selvagem BR-AD22 produtora de PLD e sua mutante ELHA-1 (OTT *et al.*, 2012). Essa alteração foi igualmente observada em nosso experimento. As amostras ELHA-1 e 2590 PLD-negativas não foram capazes de matar nenhuma lagarta, em contraste com as amostras PLD-positivas. Ambos os experimentos demonstraram a influência da PLD em modelos animais com sistema imune mais complexo.

Apesar dos números crescentes de infecções e desfechos fatais, os dados referentes à colonização de superfícies e de tecidos de superfície mucosa humanos são escassos (HACKER *et al.*, 2015). Estudos prévios demonstraram a capacidade de *C. ulcerans* em se ligar a proteínas da matriz plasmática e tecidual - Fbg, Fn e colágeno Tipo I- em níveis variados (SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2014).

Fb é a principal proteína do plasma humano, e tem sua síntese dramaticamente aumentada durante a inflamação ou sob condições de estresse, tais como infecções sistêmicas. Portanto, não surpreende que muitos patógenos bacterianos possam interagir com Fbg e manipulá-lo biologicamente (RIVERA *et al.*, 2007). Fbg está primariamente envolvido na cascata de coagulação através de sua conversão em fibrina insolúvel. Patógenos bacterianos possuem habilidade em explorar mecanismos envolvidos no sistema de coagulação para colonizar proteínas de matriz expostas ou evadir-se de mecanismos imunes de remoção bacteriana (MOSESSON, 1975; LANTZ *et al.*, 1985; SUN, 2006). A presença de Fbg nas superfícies bacterianas pode ser um excelente meio de evitar a fagocitose em hospedeiros humanos, como previamente descrito para outros patógenos Gram-positivos (SCHUBERT *et al.*, 2002; RENNERMALM.; NILSSON.; FLOCK *et al.*, 2004; PIERNO *et al.*, 2006), incluindo *C. diphtheriae* (GOMES *et al.*, 2009; SABBADINI *et al.*, 2010). Semelhante a *C. diphtheriae*, diferenças qualitativas e quantitativas na expressão de adesinas de ligação ao Fbg podem contribuir para as variações no potencial de virulência para o hospedeiro humano e na formação de pseudomembranas pelas cepas de *C. ulcerans* (SABBADINI *et al.*, 2010, SIMPSON-LOUREDO, 2014b). No estudo atual, as amostras de *C. ulcerans* interagiram com Fbg em diferentes níveis. A amostra BR-AD 22 PLD-positiva apresentou uma capacidade maior de

ligação quando comparada com sua mutante ELHA-1; as duas amostras PLD-negativas, 2590 e ELHA-1 demonstraram capacidade semelhante de ligação ao Fbg.

Fn é uma glicoproteína complexa encontrada na forma solúvel em muitos fluidos corporais (sangue, saliva) e na forma insolúvel como um componente de superfícies celulares, membranas basais, e matrizes extracelulares. Fn plasmática solúvel interage com várias bactérias e superfícies celulares, podendo servir como um receptor para a aderência da bactéria à célula epitelial do hospedeiro, tendo assim, um importante papel no tropismo tecidual e simultaneamente de ligação ao Fbg, fibrina, colágeno, células humanas e bactérias (MOSHER, 1975; RUOSLAHTI; VAHERI, 1975; ENGVALL; RUOSLAHTI, 1977; ENGVALL; RUOSLAHTI; MILLER, 1978,). Colágeno Tipo I é a forma mais prevalente de vários tipos distintos de colágeno observados em paredes arteriais, ossos, dentina, derme, tendões e parede uterina. Todos os tipo de colágeno são ativos na ligação com Fn, porém em graus variados (ENGVALL; RUOSLAHTI; MILLER, 1978). A ligação ao colágeno e Fbg é mediada pelo mesmo sítio de ligação da Fn.

As amostras de *C. ulcerans* mostraram afinidade a Fn plasmática e colágeno Tipo I humanos em intensidades variadas. De forma semelhante ao Fbg, a amostra BR-AD22 foi a que apresentou o maior grau de ligação com Fn e colágeno, como foi observado em estudo anterior (SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2014a). A amostra 210932 apresentou ligação maior a Fn do que as amostras ELHA-1 e 2590, porém não houve diferença quando observada a ligação ao colágeno.

Nematódeos exibem uma matriz extracelular rica em colágeno, chamada cutícula. As barreiras extracelulares da matriz formam linhas de defesa contra estressores ambientais químicos e microbianos. Estudos prévios demonstraram que o efeito nocaute de genes necessários para cutícula de *C. elegans* e a integridade epidérmica alterou diversas respostas ao estresse celular (DODD *et al.*, 2018). Nesse estudo, BR-AD22 PLD-positiva e 210932 PLD e TD positivas apresentaram maior capacidade de interagir com colágeno Tipo I e em acordo com estudo anterior, apresentaram menor capacidade de causar óbito dos nematódeos, possivelmente devido à afinidade com a cutícula colagenosa da matriz extracelular de vermes, o que diminuiria a disponibilidade de bactérias livres como fonte de alimento e consequente, menor ingestão. De maneira inversa, as amostras 2590 PLD-negativa e ELHA-1 PLD mutante, com menor interação com o colágeno Tipo I, foram capazes de matar maior percentual de nematódeos, uma vez que não ficaram aderidos ao colágeno da cutícula e colonizaram o TGI. Os dados sugerem que a atividade bacteriana da PLD pode favorecer a interação da cutícula e a inibição da ingestão de *C. ulcerans* por vermes.

O primeiro passo no processo de infecção de patógenos extracelulares é geralmente a adesão e a colonização da superfície dos tecidos do hospedeiro. Evidências de outros patógenos Gram-positivos sugerem que adesinas de superfície bacteriana reconhecendo moléculas de adesão na matriz podem servir como candidatas com potencial antigênico para o desenvolvimento de novas imunoterapias, inclusive para doença do tipo diftérica e infecções invasivas causadas por *C. ulcerans* (RIVERA *et al.*, 2007). Vários quadros de doença invasiva, como nódulos pulmonares, artrite, abscesso axilar e peritonite foram relatados onde o agente causal foi o *C. ulcerans*, portanto a capacidade de adesão e colonização está presente nesse patógeno, a despeito da presença de TD.

Já foi comprovada a habilidade de *C. ulcerans* em interagir com células epiteliais (Hep2 e Detroit562) e macrófagos humanos. Esses dados enfatizam a capacidade de *C. ulcerans*, um patógeno classicamente relacionado à infecção animal, de colonizar e/ou infectar tecidos humanos. A habilidade em causar lesão e se disseminar pelos tecidos parece estar relacionada à capacidade de sobrevivência intracelular e independe da presença de TD e *Shiga-like*, conforme demonstrado nos ensaios de células HEp2 e cobaios (SANTOS *et al.*, 2010; SIMPSON-LOUREDO *et al.*, 2014b; HACKER *et al.*, 2015, 2016b). No presente estudo, foi observado que a atividade citotóxica da PLD não impediu a interação dos patógenos com macrófagos e células epiteliais (HeLa). Todas as amostras de *C. ulcerans* expressaram mecanismos de interação e sobrevivência no interior de macrófagos humanos em graus variados, independente da produção de PLD e TD.

Em estudo executado anteriormente, a atividade fosfolipásica de *C. ulcerans* não interferiu na adesão e invasão de células HeLa (HACKER *et al.*, 2015). Em contraste, no estudo atual, a expressão da PLD pelas amostras mostrou interferência na aderência e invasão de células HeLa, uma vez que a amostra 2649 produtora de PLD aderiu menos porém foi capaz de se manter viável em maior número no interior das células; de maneira oposta, 2590 PLD-negativa aderiu mais e invadiu menos, em acordo com estudo publicado por Lucas *et al.* (2010), onde amostra selvagem de *Arcanobacterium haemolyticum* produtora de PLD aderiu em menor grau e invadiu em maior número quando comparada com mutante não produtora de PLD. Tais resultados corroboram que a PLD de *C. ulcerans* é mais importante para a disseminação no hospedeiro do que na adesão às células do hospedeiro (HACKER *et al.*, 2015).

A capacidade de formar biofilme é uma preocupação na Medicina, no que concerne a possibilidade em propiciar infecções graves e resistentes ao uso de antimicrobianos (GOMES *et al.*, 2013). Alguns fatores determinam a formação e extensão de biofilme quando um dispositivo médico é contaminado. Os biofilmes favorecem a manutenção dos organismos em

superfícies abióticas e substratos orgânicos e protege os micro-organismos da fagocitose, de anticorpos opsonizantes, da ativação do complemento e da fagocitose (GOMES *et al.*, 2009). Conforme relatado por Trost *et al.* (2011) e Meinel *et al.* (2014), *C. ulcerans* possui em seu genoma genes codificadores para proteínas de adesão em superfície e proteínas de fímbrias, responsáveis pelo contato e adesão às células do hospedeiro. Em estudo anterior, foi demonstrada a capacidade de formação de biofilme por amostras de *C. ulcerans* em superfícies abióticas, como poliuretano e poliestireno. Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar e evidenciar diferentes níveis de formação e arranjo do biofilme sobre o poliuretano (SIMPSON-LOUREDO, 2014). No presente estudo, a viabilidade de bactérias sésseis em biofilme foi investigada. As amostras de *C. ulcerans* mostraram capacidade de se manter viáveis independente da produção de PLD e TD, em diferentes níveis, o que está em acordo com o experimento anterior. Esse dado reforça que embora a PLD de *C. ulcerans* tenha um papel menor na aderência a superfícies bióticas e abióticas, não impede a manutenção de bactérias viáveis no biofilme e possa disseminar-se para outros locais do organismo do hospedeiro.

O ferro é essencial para o crescimento bacteriano, mas sua disponibilidade no corpo humano é muito limitada, porque está quase totalmente presente sob a forma de complexos como metaloproteínas ou glicoproteínas. Durante a infecção, a restrição do ferro é estimulada, uma vez que respostas do hospedeiro às bactérias invasoras inclui a hipoferremia. A limitação de ferro pode fazer com que os patógenos bacterianos cresçam mais lentamente; no entanto, pode estimular os micro-organismos a produzirem maior dano tecidual, uma vez que muitos fatores de virulência são controlados pelo suprimento de ferro no ambiente. *C. diphtheriae* é capaz de superar as condições do hospedeiro, produzindo sideróforos ou outros mecanismos de absorção de ferro que permitem expressar fatores de virulência, como toxinas e enzimas. Citotoxinas, sideróforos, heme oxigenase e lipoproteínas da superfície celular são reguladas tanto pelo ferro quanto pelo gene DtxR. A expressão de fatores de aderência por várias espécies bacterianas é influenciada pelo acréscimo de ferro no meio. A restrição de ferro no meio de crescimento promove a formação de biofilme (MOREIRA *et al.*, 2003). Em experimento realizado por Moreira *et al.* (2003), o ferro exerceu papel regulador em propriedades de adesão do bacilo diftérico, a carência de ferro no meio modulou a expressão de carboidratos de superfície de *C. diphtheriae*.

Até o presente momento não são descritos em literatura recente experimentos que avaliem a influência de ferro na expressão de fatores de virulência de *C. ulcerans*. Nesse estudo as amostras foram avaliadas para a expressão de PLD quando crescidas em condições de

privação e suplementação de ferro, uma vez que a PLD se liga aos fosfolípídeos da membrana de eritrócitos de carneiro no teste CAMP e o ferro regula propriedades de adesão. Não houve diferenças entre as amostras testadas, porém houve uma diminuição discreta na formação do CAMP reverso na amostra 210932 TD-positiva.

Em resumo, *C. ulcerans* é um patógeno que vem crescendo em importância em saúde pública pelo aumento do número de casos em diferentes países, com quadros de difteria e infecções invasivas e em pele. A identificação rápida de *C. ulcerans* em casos de suspeita, assim como o uso apropriado de antibióticos são essenciais para um bom desfecho da doença. *C. ulcerans* possui potencial zoonótico, se adapta a uma ampla variedade de hospedeiros e possui diversos fatores de virulência, o que indica a natureza multifatorial da doença. O estudo da espécie pode proporcionar a resolução de medidas de vigilância epidemiológica mais eficazes e a pesquisa de outros possíveis alvos para confecção de vacinas, que não a TD.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- Testes bioquímicos e fenotípicos convencionais não foram capazes de identificar todas as amostras de *C. ulcerans*, assim como o teste semi-automatizado API-Coryne.
- O método MALDI-TOF MS, atualmente muito utilizado para identificação de amostras bacterianas não deu uma identificação em nível de espécie para as amostras de *C. ulcerans* deste estudo.
- Testes genotípicos (PCR e sequenciamento) apresentaram confiabilidade para identificação de amostras de *C. ulcerans* e devem ser empregados, especialmente em casos de amostras com comportamento fenotípico atípico.
- Este estudo relatou o primeiro caso de difteria simultânea por *C. ulcerans* e MI, em parceria com a SVS-Pernambuco, em indivíduo imunizado, o que destaca a relevância do diagnóstico clínico da difteria em indivíduos previamente imunizados, assim como a gerência e o controle da difteria.
- Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos são essenciais como rotina laboratorial e para o tratamento em casos de suspeita de difteria, uma vez que a amostra de *C. ulcerans* isolada do caso clínico (2590) não apresentou sensibilidade à penicilina G por ambos os métodos de avaliação (CLSI e EUCAST-BrCAST).
- O teste CAMP foi um método fenotípico eficaz para observação da expressão da PLD por amostras de *C. ulcerans*.
- A PCR foi capaz de identificar a amplificação de sequências de nucleotídeos do gene *pld* nas amostras estudadas.
- O gene *pld* da espécie *C. ulcerans* apresentou uma grande variabilidade genética quando comparado com o gene *pld* de *C. pseudotuberculosis*.
- Os resultados obtidos sugeriram que a PLD pode influenciar no processo de interação de *C. ulcerans* com as proteínas de matriz extracelular e plasma, uma vez que houve diferença significativa entre a amostra selvagem BR-AD22 e a mutante com cópia truncada para *pld* ELHA-1. A amostra 2590 PLD-negativa exibiu resultados semelhantes aos da amostra ELHA-1 na interação com as proteínas testadas.
- *C. ulcerans* é capaz de se manter viável em biofilme, porém em níveis menores que a espécie altamente formadora de biofilme, *C. striatum*, independente da produção de TD ou PLD.

- Estudos adicionais são necessários para a construção de mutante com cópia truncada do gene *pld* da amostra 2590, uma vez que não foi obtido sucesso nessa construção, apesar das diversas sequencias de oligonucleotídeos desenhadas.
- A execução de construção de clones com plasmídeos de fluorescência em amostras de *C. ulcerans* foi realizada.
- *C. ulcerans* foi capaz de infectar em vários graus o nematódeo *C. elegans*; a expressão de PLD pode influenciar, uma vez que amostras não produtoras de PLD induziram a um maior número de óbitos; de modo contrário, a sobrevivência foi maior para amostras produtoras de PLD. A colonização do TGI dos nematódeos por amostras de *C. ulcerans* foi observada nos ensaios de microscopia de fluorescência com plasmídeo mCherry.
- Foi demonstrada a influência de PLD expressa por *C. ulcerans* nos ensaios de virulência em lagartas de *G. mellonella*.
- *C. ulcerans* foi capaz de induzir alterações em perfis hematológicos de camundongos (alterações morfológicas e no número de células) e na resposta inflamatória no local de infecção. A produção de PLD por amostras influencia nos processos de estabelecimento de infecção local e sistêmica, porém a produção de TD intensifica a resposta do hospedeiro.
- A concentração de ferro durante o crescimento bacteriano não interferiu na expressão de PLD pelas amostras quando avaliadas pelo teste CAMP.
- *C. ulcerans* foi capaz de aderir e sobreviver no interior de macrófagos em níveis variados, independente da produção de PLD.
- Para células HeLa foi observada a interferência de PLD nos processos de aderência e invasão, uma vez que a amostra PLD positiva aderiu em menor grau, mas foi capaz de sobreviver em níveis acima da amostra PLD negativa.
- Concluindo, a PLD é uma importante exotoxina produzida por *C. ulcerans*, porém não é primordial em todos os processos de patogenicidade, o que indica a natureza multifatorial da virulência do patógeno. Estudos adicionais devem ser feitos em relação à variabilidade genética do gene *pld* no sentido de esclarecer seu processo de leitura e ativação.

REFERÊNCIAS

- ALIBI, S. *et al.* Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. **Pathol. Biol.**, v.63, p.153-157, 2015.
- ANTUNES, C. A. *et al.* Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v.161, p. 639-647, 2015.
- BAIO, P.V. *et al.* Clonal multidrugresistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 23–29, 2013.
- BITRAGUNTA, S. *et al.* Safety and immunogenicity of single dose of tetanus–diphtheria (Td) vaccine among non/partially immune children against diphtheria and/or tetanus, Hyderabad, India, 2007. **Vaccine**, v. 28, p. 5934-5938, 2010.
- BOLLIGER, A. P. *et al.* Hematology of Laboratory Animals. **Schalm’s veterinary hematology**. 6. ed., Ames-Iowa, 2010.
- BONMARIN, I. *et al.* Diphtheria: a zoonotic disease in France? **Vaccine**, v. 27, p. 4196-4200, 2009.
- BRASIL. Lei 8080, 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 20/09/1990. Seção 1, p.18055.
- BRASIL. ANVISA. **Plano Diretor de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Ano 10, n. 2, 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCAs)**. Brasília, DF, 2013a.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea**. Brasília, DF, 2013b.
- BRODWAY, M. *et al.* Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. **J. Bacteriol.**, v. 195, n.16, p. 3774–3783, 2013.
- BURKOVSKI, A. Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. **ISRN Microbiol.**, p. 1-11; 2013.
- CDC. Center of Disease Control and Prevention. **Diphtheria-Clinical Features**. 2108. Disponível em: <https://www.cdc.gov/diphtheria/clinicians.html>. Acessado em: 18 fev. 2019.

CEZAR, G.; ABRANTES, P. C. C. Princípio da Precaução: considerações epistemológicas sobre o Princípio e sua relação com o processo de análise de risco. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 2, p. 225-262, 2003.

CHAVES-MOREIRA *et al.* Identification of direct hemolytic effects on the catalytic activity induced by Phospholipase D (dermonecrotic toxin) from brown spider. **J. Cel. Biochem.**, v.107, p. 655–666, 2009.

CHRISTIE, R.; ATKINS, N.E., MUNCH-PETERSEN, E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 22, p. 197-200, 1944.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 10. ed. 2019. (CLSI document M02-A10).

CORBOZ, L. Isolation of *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *belfanti* from a cow with chronic active dermatitis. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 138, n. 12, p. 596-599, 1996.

DALLARI, S. G.; VENTURA, D. F. L. O princípio da precaução: dever do Estado ou protecionismo disfarçado? **São Paulo em Perspectiva**, v. 16, n. 2, p.53-63, 2002.

DESSEAU, R.B. *et al.* Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. **Eur. Respir. J.**, v. 8, n.4, p. 651-653, 1995.

DE ZOYSA, A. *et al.* Molecular epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from Northwestern Russia and surrounding countries studied by using ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1080-83, 1995.

DIAS, A. A. S. O. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. **Vec. Born. Zoon. Dis.**, v. 10, n. 8, p. 743-748, 2010.

DIAS, A. A. S. O. *et al.* *Corynebacterium ulcerans*: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. **Rev. Saúde Pública**, v. 45, p. 6, 2011a.

DIAS, A. A. S. O. *et al.* Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. **Vet. Microbiol.**, v.15, n. 3-4, p. 323-31, 2011b.

DODD, W. *et al.* A damage sensor associated with the cuticle coordinates three core environmental stress responses in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 208, p. 1467-1482, 2018.

DOMINGOS, M. C. *et al.* Draft genome sequences of two toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains. **Genome Announc.**, v. 3, n.3; p. 9-15, 2015.

DONLAN, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v.7, n.2, p. 277-281, 2001.

DORELLA, F.A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet Res**, v. 37, p. 201–218, 2006.

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

ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin to collagen. **Int. J. Cancer.**, v. 20, p.1-5, 1977.

ENGVALL, E., RUOSLAHTI, E.; MILLER, E. J. Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. **J. Exp. Med.**, v 147, p.1584-1595, 1978.

EUCAST-BRCAS. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- Br-CAST. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos-Corynebacterium spp.** 2017.

FUNKE, G.; BERNARD, A.K. Coryneform Gram-positive rods. **Manual of clinical microbiology.** Washington, DC: Ed. ASM Press, p. 485–514. 2009.

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

GOMES, D. L. R. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 1419–1427, 2009.

GOMES, D. L. R. *et al.* SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, n. 5, p. 754-760, 2013.

GREEN; M, R; SAMBROOK, D.W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 4. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nova Iorque, 2012.

HACKER, E. **Characterization of virulence factors of *Corynebacterium ulcerans*.** 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Faculdade de Ciências Naturais, Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg, Alemanha, 2011.

HACKER, E. *et al.* Colonization of human epithelial cell lines by *Corynebacterium ulcerans* from human and animal sources. **Microbiol.**, v.161, 1582–1589, 2015.

HACKER, E. *et al.* *Corynebacterium ulcerans*, an emerging human pathogen. **Future Microbiol.**, v. 11, n. 9, 2016a.

HACKER, E. *et al.* The killing of macrophages by *Corynebacterium ulcerans*. **Virulence**, v. 7, p. 45-55, 2016b.

HADFIELD, T. L. *et al.* The pathology of diphtheria. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 116-120, 2000.

HALL, A. J. *et al.* Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, p. 688-691, 2010.

- HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- HATANAKA, A. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. **Emerg. Infect. Dis.**; v. 9, p. 752-753, 2003.
- HIRATA JR, R. *et al.* Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheria* of different clonal groups in endocarditis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, p. 986-991, 2008.
- HOMMEZ, J. *et al.* Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p.954–957, 1999.
- KATSUKAWA, C. *et al.* Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* isolated from the domestic dog for the first time in Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 62, p. 171-172, 2009.
- KATSUKAWA, C. *et al.* Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka, Japan. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 266-273, 2012.
- KHAN, N *et al.* Resurgence of diphtheria in the vaccination era. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 25, p. 434, 2007.
- KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *Corynebacterium* species *rpoB* gene sequencing for identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 3925–3931, 2004.
- KNOPPOVÁ, M. *et al.* Plasmid vectors for testing in vivo promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. **Curr Microbiol.**, v.55, 234-239, 2007.
- KONRAD, R. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. **Euro Surveill.**, v.15, n.43, pii=19699, 2010.
- JAKOBY, M.; NGOUOTO-NKILI C. E., BURKOVSKI, A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. **Biotechnol. Tech.**, v. 13, p. 437-441, 1999.
- JANDER, G.; RAHME; L.G; AUSUBEL, F.A. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 13, p. 3843–3845, 2000.
- LANTZ, M.S. *Bacteroides intermedius* binds fibrinogen. **J. Bacteriol.**, v. 163, p.623-628, 1985.
- LEGGET, B.A. Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from a wound in a horse. **Vet. Rec.**, v. 166, v. 21, p. 656-657, 2010.
- LUCAS, E. A. *et al.* Phospholipase D promotes *Arcanobacterium haemolyticum* adhesion via lipid raft remodeling and host cell death following bacterial invasion. **BMC. Microbiol.**, v.10, p. 270, 2010.

- MAHMOOD, Z.H.A. *et al.* Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (phospholipase D): A comprehensive study in goat. **Vet. World**, v.8, n.9, p.1105-1117, 2015.
- MAN, P. *et al.* Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen/deuterium exchange measurements. **FEBS J.**, v. 277, p. 653-666, 2010.
- MANDLIK, A. *et al.* Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. **Trends Microbiol.**, v.16, n. 1, p. 33-40, 2008.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ORTEGA, M. C.; SUÁREZ, A. I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1318-21, 1995.
- MATTOS-GUARALDI, A. L. *et al.* Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, p. 159-166, 1999.
- MATTOS-GUARALDI, A. L. *et al.* First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing diphtheria-like toxin in human with pulmonary infection in Rio De Janeiro metropolitan area, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 103, p. 396-400, 2008.
- MATTOS-GUARALDI, A. L. *et al.* Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 60, p.1685-1688, 2011.
- MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA JR, R.; DAMASCO, P. V. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos sobre o cenário atual. **Rev. Ass. Bras. Imun.**, v. 1, p.1-19, 2011.
- MATTOS-GUARALDI, A.L., HIRATA JR, R., AZEVEDO, V.A. *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* - General Aspects, p15-27. ***Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species**. Springer Science, 2014.
- MAY, M. L. A.; MCDOUGALL, R. J.; ROBSON, J. M. *Corynebacterium diphtheria* and the returned tropical traveler. **J. Travel Med.**, v. 21, p. 39-44, 2014.
- MCNAMARA, P. J.; CUEVAS, W. A.; SONGER, J.G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. **Gene**, v. 14, n. 156, p. 113-118, 1995.
- MEINEL, D. M. *et al.* Next generation analysis of nine *Corynebacterium ulcerans* reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria tox- encoding pathogenicity island. **Genome Med.**, v.6, p.113, 2014. Disponível em: <http://genomemedicine.com/content/6/11/113>. Acesso em: 17 de janeiro de 2019.
- MEINEL, D. M. *et al.* Zoonotic transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strain, Germany, 2012. **Emerg. Infect. Dis.**, v.21, p. 356-358, 2015.

MOCHIZUKI, Y. *et al.* A novel experimental platform for toxigenic and non-toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection in mice. **FEMS Pathog. and Dis.**, v. 74, n. 2, p.1-7 2016.

MOREIRA, L.O. *et al.* Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 10, p. 5907-5913, 2003.

MOSESSON, M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, p.1894-1904, 1975.

MOSHER, D. F. Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p.6614-6621, 1975.

NAKAO, H. *et al.* Heterogeneity of diphtheria toxin gene *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 7, p. 1711-176, 1996.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Immunization, vaccines and biologicals:** recommended surveillance standard of diphtheria. Disponível em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/diphtheria_standards/en. Acessado em: 20 jul. 2014.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Diphtheria reported cases.** Disponível em: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidediphtheria.html. Acessado em: 01 set. 2018.

OTT, L. *et al.* Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 413-421, 2012.

PACHECO, L. G. *et al.* Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 4, p. 480-6, 2007.

PAVAN, M. E. *et al.* Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*). **Res. Vet. Sci.**, v. 92, n. 2, p. 202-206, 2011.

PEIXOTO, R. S. *et al.* Invasion of endothelial cells and arthritogenic potential of endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheria*. **Microbiol.**, v. 160, p. 537-546, 2014.

PEIXOTO, R. S. *et al.* Functional characterization of the collagen-binding protein DIP2093 and its influence on host-pathogen interaction and arthritogenic potential of *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiol.**, v.163, p. 692-701, 2017.

PEEL, M. M. *et al.* Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 2, p. 185- 191, 1997.

PEREIRA, G. A. *et al.* Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 507-510, 2008.

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

PIERNO, M. *et al.* FbsA-driven fibrinogen polymerization: a bacterial "deceiving strategy". **Phys. Rev. Lett.** DOI: 10.1103/PhysRevLett.96.028108, 2006.

PIMENTA, F. P. *et al.* A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, n. 11, p. 1438-9, 2008.

RENNERMALM, A.; NILSSON, M.; FLOCK, J.I. The fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis* is a target for opsonic antibodies. **Infect. Immun.**, v 72, p.308, 2004.

RIVERA, J. *et al.* Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. **Thromb. Haemost.**, v. 98, p.503-511, 2007.

RUOSLAHTI, E., VAHERI, A. Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma. **J. Exp. Med.**, v. 141, p.497-501, 1975.

SABBADINI, P. S. *et al.* Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 706-711, 2010.

SABBADINI, P. S. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. **Microb. Pathog.**, v. 52, p. 165-176, 2012.

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

SANGAL, V. *et al.* Diphtheria-like disease caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strain. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 20, n. 7, p.1257-1258, 2014.

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

SANTOS, C. S. *et al.* Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. **Microbiol. Immunol.**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2010.

SANTOS, L.S. *et al.* Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects. **Epidemiol. Infect.**, v. 143, p.791–798, 2015a.

SANTOS, L.S. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* putative tellurite-resistance protein (CDCE8392_0813) contributes to the intracellular survival in human epithelial cells and lethality of *Caenorhabditis elegans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 662-8, 2015. DOI: doi.org/10.1590/0074-02760140479, 2015b.

- SANTOS, E. W. *et al.* Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.
- SCHÄFER, A. *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, v.145, p. 69-73. 1994.
- SCHMIEL, D.H.; MILLER, V.J. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes Infect.**, v. 1, p.1103-1112, 1999.
- SCHUHEGGER, R. *et al.* Pigs as source for toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, p. 1314-1315, 2009.
- SEKAR, S. K. R *et al.* Strengthening the laboratory diagnosis of pathogenic *Corynebacterium* species in the Vaccine era. **Letters in Applied Microbiology**, v. 65, p. 354-365, 2017.
- SEKIZUKA, T. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheria* NCTC 13129 prophage. **BMC Microbiology**, v. 12, n.72, p.1-7, 2012.
- SETO, Y. *et al.* Properties of coryneophage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 61, p. 116-122, 2008.
- SIMPSON-LOUREDO, L. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 2, p. 343-352, 2014.
- SIMPSON-LOUREDO, L. **Isolamento, caracterização e potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium ulcerans* oriundas de cães domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro.** 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- SIMPSON-LOUREDO, L. *et al.* Detection and virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a concurrent diphtheria and infectious mononucleosis case. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01240-4>.
- SOARES, S. C. *et al.* Plasticity of *Corynebacterium diphtheriae* pathogenicity islands revealed by PCR. **Genet. Mol. Res.**, v. 10, n. 2, p. 1290-1294, 2011.
- SOUČKOVÁ, A.; SOUČEK, A. Inhibition of the hemolytic action of α and β lysins of *Staphylococcus pyogenes* by *Corynebacterium hemolyticum*, *C. ovis* and *C. ulcerans*. **Toxicon**, 1972, v.10, p. 501-509, 1972.
- SYKES, J. E. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* bronchopneumonia in a dog. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 24, p. 973-976, 2010.

- SUBEDI, R. *et al.* Genomic analyses reveal two distinct lineages of *Corynebacterium ulcerans* strains. **New Microbe and New Infect.**, v. 25: p. 7–13, 2018.
- SUN, H. The interaction between pathogens and the host coagulation system. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p.281-288, 2006.
- TAUCH, A.; BURKOVSKI, A. Molecular armory or niche factors: virulence determinants of *Corynebacterium* species. **FEMS Microbiol. Let.**, v. 362, 2015.
- TENNEY, J. H. *et al.* Adherent microorganisms on luminal surfaces of long-term intravenous catheters. **Arch. Intern. Med.**, v.146, p.1949-1954, 1986.
- TIWARI, T.S.P. *et al.* Investigations of 2 cases of Diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 48, p. 395-401, 2008.
- TORRES, L. F. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 272-279, 2013.
- TROST, E. *et al.* Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. **BMC Genomics**, v. 12, p. 383, 2011.
- VENTURA, M. *et al.* Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.
- VIANA, M.V.C. *et al.* Genome Sequence of *Corynebacterium ulcerans* Strain 210932. **Genome Announc.**, v. 2, n. 6: e01233-14. doi:10.1128/genomeA.01233-14, 2014.
- VON HUNOLSTEIN, C. *et al.* Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 181-188, 2003.
- WAGNER, K. S. *et al.* Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. **Epidemiol. Infect.**, v. 138, p. 1519-1530, 2010.
- WANG, J.; LONDON, E. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. **Biochemistry**, v. 48, p. 10446-10456, 2009.
- WONG, T. P.; GROMAN, N. Production of diphtheria toxin by selected isolates of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 43, p. 1114-1116, 1984.
- ZAKIKHANY, K., NEAL, S., EFSTRATIOU, A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United Kingdom, 2003–2012. **Euro Surveill.**, v.19, n.22, pii=20819, 2014.
- ZAMIRI, I.; McENTEGAR, M.G.T. The sensitivity of diphtheria bacilli to eight antibiotics. **J. Clin. Path.**, v. 25, p.716-717, 1972.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A TESE DE DOUTORADO

Antonie van Leeuwenhoek
https://doi.org/10.1007/s10482-019-01240-4



ORIGINAL PAPER

Detection and virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a concurrent diphtheria and infectious mononucleosis case

Liliane Simpson-Lourêdo · Cecília M. F. Silva · Elena Hacker ·
Nadja F. Souza · Milena M. Santana · Camila A. Antunes · Prescilla E. Nagao ·
Raphael Hirata Jr. · Andreas Burkovski · Maria Helena S. Villas Bôas ·
Ana Luíza Mattos-Guaraldi

Received: 26 October 2018 / Accepted: 22 January 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract Zoonotic Diphtheria by *Corynebacterium ulcerans* is increasingly occurring in children, adolescents and adults. In addition to diphtheria toxin (DT), phospholipase D (PLD) is considered as **AQ1** virulence factor of *C. ulcerans*. In the present study, a first case of concurrent diphtheria by a PLD-negative *C. ulcerans* and infectious mononucleosis (IM) was **AQ2** verified. Clinical and microbiological profiles and binding properties to human Fibrinogen (Fbg), Fibronectin (Fn) and type I collagen (col I)

biotinylated proteins and virulence to *Caenorhabditis elegans* were investigated for *C. ulcerans* strain 2590 (clinical isolate) and two control strains, including **AQ3** PLD-positive BR-AD22 wild type and PLD-negative ELHA-1 PLD mutant strains. MALDI-TOF assays **AQ4** and a multiplex PCR of genes coding for potentially toxigenic corynebacteria identified strain 2590 as non-DT producing. Interestingly, strain 2590 did not express PLD activity in the CAMP test although the presence of *pld* gene was verified. PLD-negative 2590

A1 L. Simpson-Lourêdo · M. H. S. Villas Bôas
A2 Microbiology Department, National Institute for Quality
A3 Control in Health, Fundação Oswaldo Cruz,
A4 Rio de Janeiro, Brazil

A5 L. Simpson-Lourêdo · C. M. F. Silva ·
A6 C. A. Antunes · R. Hirata Jr. · A. L. Mattos-Guaraldi
A7 Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical
A8 Relevance, School of Medical Sciences, UERJ,
A9 Rio de Janeiro, Brazil

10 L. Simpson-Lourêdo · E. Hacker · C. A. Antunes ·
11 A. Burkovski
12 Friedrich-Alexander Universität-Erlangen-Nürnberg,
13 Erlangen, Germany

14 N. F. Souza · M. M. Santana
15 Central Laboratory of Public Health, Recife, Pernambuco,
Brazil

A20 A. L. Mattos-Guaraldi (✉)
A21 Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical
A22 Relevance - Faculdade de Ciências Médicas,
A23 Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Av. 28
A24 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar. Vila Isabel,
A25 Rio de Janeiro, RJ 20.551, Brazil
A26 e-mail: aguaraldi@gmail.com

and a PLD-positive 210932 strains showed similar affinity to Fbg, Fn and type I collagen. *C. elegans* were capable to escape from *C. ulcerans* strains, independent of PLD and DT production. Higher mortality of nematodes was verified for PLD-negative strains. Additional studies concerning multifactorial virulence potential of *C. ulcerans*, including environmental conditions remain necessary.

Keywords Co-infection · *Corynebacterium ulcerans* · Diphtheria · Infectious mononucleosis · Virulence factors · Zoonosis

Introduction

Diphtheria of zoonotic nature and extrapharyngeal infections (skin lesions, pneumonia and lymph node abscess) caused by *Corynebacterium ulcerans* have been increasing in industrialised and developing countries, including Brazil (Mattos-Guaraldi et al. 2008; Dias et al. 2011a; Wagner et al. 2012; Simpson-Loureiro et al. 2014; Hacker et al. 2015; Yasuda et al. 2018). At first, zoonotic diphtheria cases were mainly restricted to rural population and associated with contact with dairy cattle and consumption of unpasteurised dairy products (Dias et al. 2011a; Mattos-Guaraldi et al. 2013). During the last decades, a wide range of wild and domestic animals, including pets, such as dogs and cats, were described as *C. ulcerans* reservoirs (Dias et al. 2011a; Simpson-Loureiro et al. 2014; Hacker et al. 2015). Human infections by *C. ulcerans* may be fatal and mostly occur in adults with close animal contact as reviewed by Dias et al. (2011a, b). Therefore, there is a potentially large reservoir of infection with little knowledge about the risks of zoonotic transmission (Dias et al. 2011a; Simpson-Loureiro et al. 2014; Zakikhany and Efstratiou 2012).

Diphtheria caused by *Corynebacterium diphtheriae* is still endemic in all continents, in many developing countries, including India, Nigeria, Venezuela and Brazil, although it is a vaccine-preventable disease (Jacob-John 2008; Bonmarin et al. 2009; WHO 2018). In patients with a history of incomplete immunization, diagnoses can be difficult (Perkins et al. 2010). Although diphtheria toxin (DT) is the major known virulence factor of diphtheria pathogens, there has

been a noticeable increase in the number of patients presenting with one of the toxin-induced complications of the illness without any prominent evidence of local pharyngeal infection (pseudo membrane) or without presentation of systemic toxin-induced complications (Mattos-Guaraldi et al. 2011). Cases of concurrent diphtheria by *C. diphtheriae* and infectious mononucleosis (IM) were previously described, including in Brazil (Haight and Holden 1982; Perkins et al. 2010; Mattos-Guaraldi et al. 2011).

In Europe, *C. ulcerans* is currently isolated more frequently from diphtheria cases than *C. diphtheriae* (Dias et al. 2011a; Wagner et al. 2012; Mattos-Guaraldi et al. 2013; Zakikhany and Efstratiou 2012). However, *C. ulcerans* does not cause large epidemics and human-to-human transmission remains unclear (Dias et al. 2011a; Bonmarin et al. 2009), despite a possible case of human-to-human transmission of toxigenic *C. ulcerans* is described in literature (Konrad et al. 2015).

In addition to DT production, the exotoxin phospholipase D (PLD) is produced by potentially toxigenic zoonotic pathogens *C. ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* and generally considered as its well-known virulence factor (Dias et al. 2011a; Mattos-Guaraldi et al. 2013). PLD was found to induce dermo necrotic lesions, increased vascular permeability in vivo and synergistic hemolysis of sheep blood cells. Studies with *C. pseudotuberculosis* strains with inactivated PLD have convincingly demonstrated the necessity of PLD for establishment of diseases in animals, including caseous lymphadenitis (McNamara et al. 1995; Hodgson et al. 1994). However, virulence potential of *C. ulcerans* needs further investigation, including PLD capacity to have effects in establishment and severity in human infections.

In the present study, a case of concurrent diphtheria by *C. ulcerans* and IM was first identified. In addition to clinical and microbiological profiles, influence of PLD production in virulence mechanisms by *C. ulcerans* clinical isolate was evaluated, such as Extracellular matrix (ECM) and plasma proteins binding properties and *C. elegans* survival response to *C. ulcerans* infection.

Materials and methods

Co-infected patient

A 15-year-old previously healthy male living in urban area of Chã Grande, Pernambuco State, Brazil, was attended at public outpatient care center 10 days after the onset of sore throat and fever. Primary care diagnosed illness as pharyngitis and the patient was empirically treated with penicillin G benzathine. Two days later, the patient remained without significant clinical improvement and returned to the hospital and unsuccessful therapy with amoxicillin was administered. Clinical signs included presence of a grayish-white membrane from tongue extended on pharynx and retropharyngeal area, dysphagia, lymph node edema, “bull neck” and signs of systemic toxicity, suggestive of classic respiratory diphtheria. Accordingly, the patient was admitted to the pediatric isolation unit of the diphtheria reference hospital and antimicrobial therapy with azithromycin was initiated and complementary laboratory investigations for diphtheria and infectious mononucleosis-IM were also carried out. Evidence of cardiomyopathy was not detected by physical examination. Due to the improvement of the clinical conditions, absence of rash or fever and the normal results of hemogram and serum biochemistry, the patient was discharged 1 day later. In a second clinical evaluation, 14 days later, the presence of lesions in lower lip and chin was observed and positive results of Epstein-Bar Virus antibody testing (IgM-160 U/ml and IgG-144U/ml) confirmed IM co-infection. Patient presented a good general state of health and was discharged. According to information given by parents, patient’s vaccination schedule for diphtheria was considered complete. The case was conclusively notified to the Brazilian Department of Health authorities as diphtheria-IM co-infection. Epidemiological investigation for asymptomatic carrier state of humans ($n = 11$) and animals (horses $n = 3$ and dogs = 2) close contacts gave negative results for both *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*. Dairy products (curd cheese) considered as possible infection source of *C. ulcerans* were evaluated by bromatological analysis and gave negative results. Patient and contacts ($n = 300$), including immune individuals from family and neighborhood, received vaccine booster doses.

Clinical isolate identification

Bacterial sample of irregular Gram-positive rods (IGPR) collected from pharynx exudative material of patient was isolated and preliminarily analysed by the Central Laboratory of Public Health—Pernambuco (LACEN—PE); then, it was sent to the Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (LDCIC/UERJ) for definitive identification by using phenotypic and molecular methods, named as *C. ulcerans* strain 2590. Clinical isolate was characterised by colonial morphology, pigmentation, hemolysis (CAMP test) and deoxyribonuclease (DNase) activity and phenotypic profiles determined by conventional biochemical assays and by the semi-automatised API-Coryne System 4.0 (BioMérieux, Lyon, France) read until 48 h incubation as previously described by other authors (Simpson-Louredo et al. 2014; Pimenta et al. 2008).

Molecular identification of the IGPR strains was carried out by a Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) method, as previously described (Alibi et al. 2015; Konrad et al. 2010). A multiplex PCR (mPCR) was also carried out to provide identification of potentially toxigenic corynebacterial species, based on primers targeting the following genes: *rpoB* (*Corynebacterium* spp.), *16S rRNA* (*C. ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*), *pldR2* (only for *C. pseudotuberculosis*), *dtxR* (*Corynebacterium diphtheriae*) and *tox* gene (diphtheria toxin-DT) (Torres et al. 2013).

Corynebacterium ulcerans strains from different sources described in Table 1 were used as controls of experiments, including ELHA-1 *pld* mutant previously constructed from BR-AD22 wild-type with *pld* gene disrupted (Hacker et al. 2015). Control strains were stocked in 10% skim milk with 25% added glycerol at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ and recovered as required by cultivation in Trypticase Soy Agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h under aerobic conditions.

Antimicrobial susceptibility tests

Antimicrobial susceptibility profiles were achieved by disk-diffusion method on 5% sheep blood agar (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and breakpoints for coryneforms were

Table 1 Origin and phenotypic profiles of *Corynebacterium ulcerans* used in this study

Strains ^a	Origin	MALDI – TOF score	tox gene	PLD activity		Catalase	DNase	O/129
				<i>pld</i> gene	CAMP test			
2590 ^b	Human	1.934	–	+	–	+	+	S
ELHA1- <i>pld</i> mutant	Dog	2.080	–	D	–	+	+	S
BR-AD22 wild type ^c	Dog	2.203	–	+	Rev	+	+	S
210932 ^d	Human	2.072	+	+	Rev	+	+	S

^aGenBank accession number MPST00000000^b; CP002791.1^c; CP009500.1^d

+ positive, – negative; Rev reverse, S susceptible, *pld* phospholipase D, O/129, pteridine derivative vibriostatic agent O/129, D disrupte

determined in accordance to CLSI guidelines (2015). Sensitivity to the pteridine derivative vibriostatic agent O/129 (150 µg) was also evaluated (CLSI 2015).

Phospholipase D activity tests

PLD activity was evaluated by the CAMP test (i.e., inhibition of hemolysis by *Staphylococcus aureus*) (Simpson-Louredo et al. 2014). As primers used in mPCR are not specific to *C. ulcerans pld* gene, PCR assays based on method previously described using primers targeting *C. ulcerans pld* gene (PLD R1 and PLD-F) were also carried out (Pacheco et al. 2007).

ECM and plasma proteins binding assays

Bacterial binding assays using biotinylated fibrinogen (Fbg), fibronectin (Fn) and type I collagen (all from Sigma Chemical Co.) were performed as previously described by Simpson-Louredo et al. (2014). Briefly, a standard curve was performed by diluting biotinylated protein solutions to concentrations varying from 5 to 0.05 µg (1 h/37 °C). Aliquots (100 µL) of bacterial suspensions (5×10^9 CFU/mL) were mixed with 20 µg/mL of biotinylated ECM/plasma proteins for 1 h at 37 °C. The reaction was read in $\lambda = 450$ nm in a microtiter plate reader. The colour intensity of the wells inoculated with the microorganisms was compared to the standard curve by GraphPad Prism 6.0 version. The results were expressed in micrograms of adhered proteins, in a mean \pm SD of three independent assays performed in triplicate. The mean of the binding properties was compared by Tukey's multiple comparison test.

Caenorhabditis elegans infections assays

Caenorhabditis elegans N2 was maintained on agar plates inoculated with *Escherichia coli* strain OP50 for 6 to 7 days until the worms become starved, indicated by clumping behavior. Subsequently, the nematodes were infected with different *C. ulcerans* strains, as well as *E. coli* OP50. Infection of LA stage larval worms was carried out with 20 µl of each bacteria strain (from an overnight culture) on nematode growth media (NGM) plates at 20 °C or 37 °C for 24 h. Worms were assessed each day following infection and the dead nematodes were counted and removed every 24 h. For each strain, approximately 60 nematodes were used, and the assays were performed three times. The Kaplan–Meier survival analysis was used, and all statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 version, with *P* values of less than 0.05 considered significant. Morphological changes of *C. elegans* during interaction between nematodes and bacteria were inspected by light microscopy (Nikon C-DSD 230) and photographed: deformed anal region (Dar) morphology, aggregates of worms (Worm-star formation) and internal egg hatching (Worm bagging) (Ott et al. 2012; Antunes et al. 2016). The chemotaxis assay protocol was adapted from Antunes et al. (2016).

In order to visualize gut colonisation, nematodes were infected with *C. ulcerans* strain 2590 transformed with fluorescent plasmid pXMJ19mcherry as well as unlabelled *E. coli* OP50 and strains were analysed by fluorescence microscopy. Infection of 20 LA stage larval worms was carried out with 20 µl of each bacteria strain (from an overnight culture) on NGM plates at 21 °C for 24 h. *C. elegans* was

transferred to plates with 20 μ l of unlabelled *E. coli* OP50 for further 24 h, to allow the gut to clear of fluorescent organisms and cell debris. Worms were assessed each day following infection. Transfer back to *E. coli* OP50 is essential following infection as corynebacteria are not a preferred prey source for *C. elegans* and continued feeding results in the nematodes attempting to leave the culture plates. Nematodes were paralysed with 20 mM sodium azide, mounted onto agar pads and photographed using a Leica DMR fluorescence microscope (Ott et al. 2012; Antunes et al. 2016).

Results

Bacterial identification

Clinical bacterial isolate was identified by MALDI-TOF. The result was consistent with molecular identification of *C. ulcerans* by a multiplex PCR (mPCR) of genes coding for potentially toxigenic

corynebacterial. Figure 1 illustrated phenotypic features of *C. ulcerans* strain 2590 including colonial morphology, pigmentation, hemolysis and DNase activity. The presence of *tox* gene coding for DT sequence was not detected for strain 2590 (Fig. 2). Phenotypic profiles of *C. ulcerans* strains are displayed in Table 1. PLD-negative 2590 and PLD-positive BR-AD22 strains showed API-codes 0115777 and 0111324, respectively, with differences in fermentation of ribose, xylose, sucrose, mannose, lactose and glycogen.

Antimicrobial susceptibility profiles

PLD-negative *C. ulcerans* strain 2590 showed resistance to penicillin G and clindamycin, among 12 antimicrobial agents tested, as observed for PLD-positive strains, independent of DT production. Comparative analyses of PLD-positive wild type BR-AD22 with PLD-negative ELHA-1 mutant showed differences in susceptibility to β -lactams antimicrobial agents: Penicillin, R to S; ampicillin, S to R (Table 2).

PLD activity

The presence of *pld* gene sequence coding for *C. ulcerans* was detected for strain 2590 and PLD-positive BR-AD22 wild type and DT-positive 210932

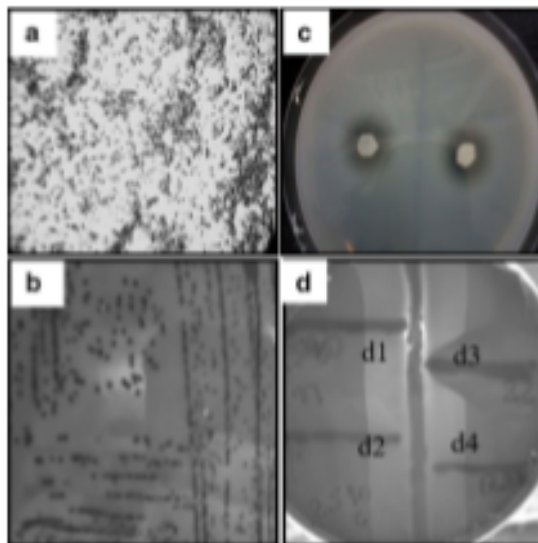


Fig. 1 Morphological and phenotypic features of *Corynebacterium ulcerans* strain 2590 isolated from a patient with concurrent zoonotic diphtheria and infectious mononucleosis. **a** Irregular Gram-positive rods observed by Gram staining; **b** Colonial morphology in chocolate-tellurite-agar; **c** DNase positive-test; **d** negative phospholipase D (PLD) production by *C. ulcerans* strain 2590 in CAMP test (d1 and d2). BR-AD22 wild-type PLD-positive (d3) and ELHA-1 PLD-negative mutant (d4) were used as controls of experiments

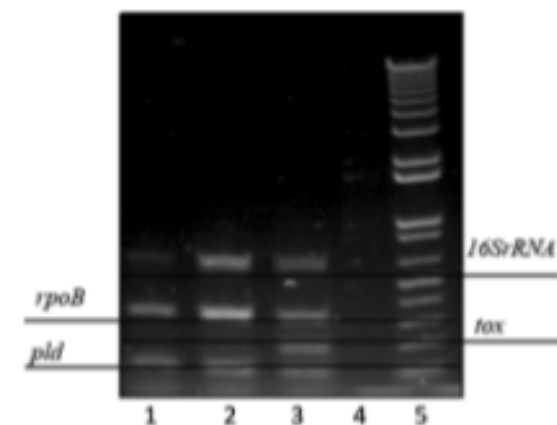


Fig. 2 *Corynebacterium ulcerans* strain 2590 isolated from a patient with concurrent zoonotic diphtheria and infectious mononucleosis evaluated by an mPCR for potentially toxigenic corynebacterial coding for 16S rRNA, *rpoB*, diphtheria toxin *tox* and *C. ulcerans pld* genes. Lane 1: BR-AD22 wild-type; lane 2: 2590; lane 3: 210932 *C. ulcerans* strains and lane 4: negative control (deionised water); lane 5: ladder (100 kb)

Table 2 Antimicrobial susceptibility profiles of *Corynebacterium ulcerans* strains evaluated by disk-diffusion method

<i>C. ulcerans</i> strains	Penicillin G (10 µg)	Ampicillin (10 µg)	Erythromycin (1.5 µg)	Clindamycin (2 µg)	Rifampicin (5 µg)	Cefoxitin (30 µg)	Imipenem (15 µg)	Gentamicin (10 µg)	Linezolid (30 µg)	Vancomycin (30 µg)	Tetracycline (30 µg)	Ciprofloxacin (5 µg)
2590	R	ND	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ELHA-1 PLD mutant	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	ND	S
BR-AD 22 wild type	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
210932	R	R	S	R	S	S	S	ND	S	S	S	S

Antimicrobial susceptibility profiles determined according CLSI (2015)

S susceptible, R resistant. Intermediate breakpoints were considered as resistant strains. ND not determine

strains (Fig. 2). However, PLD expression evaluated by CAMP test gave negative results for both 2590 and ELHA-1 *pld* mutant strains (Fig. 1).

ECM and plasma proteins binding properties

Results of evaluation on ability of *C. ulcerans* to bind to human Fbg, Fn and type I collagen molecules are displayed in Fig. 3. The highest affinity to Fbg, Fn and type I collagen was observed for PLD-positive BR-AD22 wild type strain ($P < 0.005$). ELHA-1 *pld* mutant strain presented significant reduction in adherence levels to Fbg, Fn and type I collagen, when compared to the BR-AD22 wild type strain on binding properties to human EMC/plasma proteins. However, PLD-negative strain 2590 showed similar levels of collagen, Fb and Fn binding activities to PLD-positive 210932.

Caenorhabditis elegans survival in response to *C. ulcerans* infection

Death of nematodes was detected since the first day post-infection with all PLD-positive and PLD-negative *C. ulcerans* strains tested, but at different levels (Fig. 4). The highest levels of mortality of nematodes were observed for PLD-negative *C. ulcerans* strain 2590 (69%) and ELHA-1 mutant strain (67%). PLD-positive *C. ulcerans* BR-AD22 wild type (48%) and 210932 control (44%) strains expressed a lower ability of leading death of nematodes, independent of DT production. Presently, *C. ulcerans* strains were found unable to kill 100% of worms during assessed time of experiments (4 days). Results also showed negative chemotaxis behavior of the nematodes towards all *C. ulcerans* strains tested (data not shown).

Morphological changes of *C. elegans* in response to *C. ulcerans* infection

Data displayed in Fig. 5 showed that all four *C. ulcerans* strains tested were found capable of inducing morphological changes of anal region (Dar phenotype) (Fig. 5a, b). Moreover, all four strains induced internal egg hatching (bagging) (Fig. 5d) and formation of "worm-star" aggregates (star formation) (Fig. 5c-g) in *C. elegans* nematodes. Differences in number of infected worms expressing morphological changes

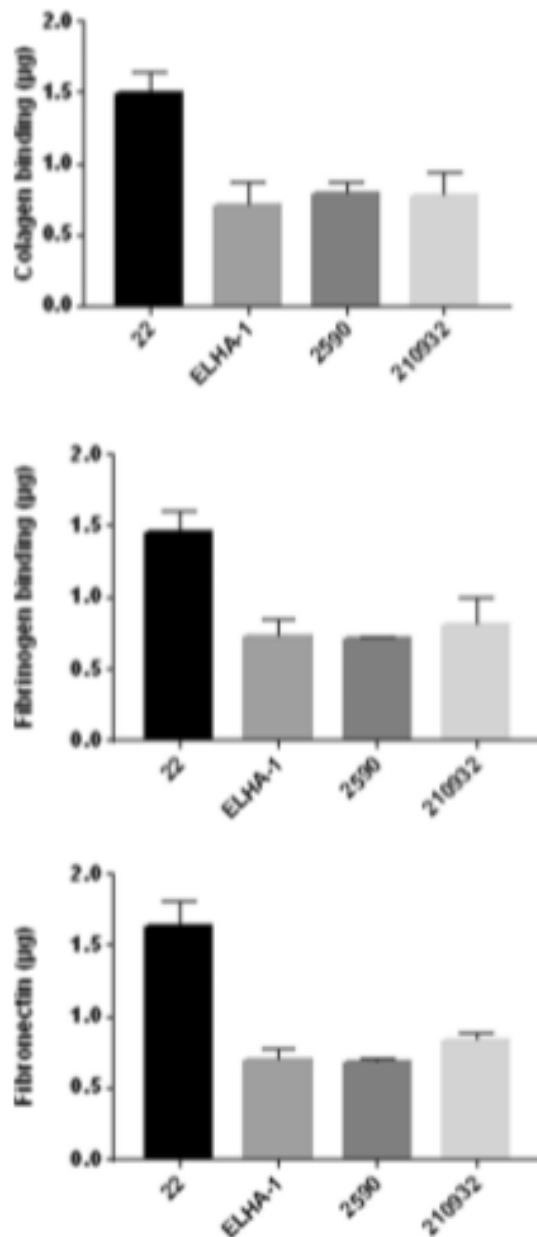


Fig. 3 Influence of Phospholipase D (PLD) on binding to human fibrinogen, fibronectin and type I collagen by *Corynebacterium ulcerans* evaluated by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): PLD-positive BR-AD22 wild type, ELHA-1 PLD mutant, PLD-negative 2590 and PLD-positive 210932 strains. Highest affinity to Fbg, Fn and Type I collagen for BR-AD22 strain ($P < 0.05$). The results were expressed in mean \pm SD of three independent assays performed in triplicate

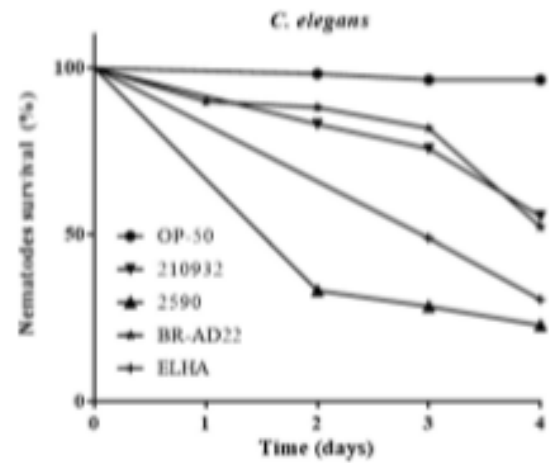


Fig. 4 *Caenorhabditis elegans* mortality (%) due to 4 days infection by *Corynebacterium ulcerans* phospholipase D (PLD)-positive BR-AD22 wild-type, 210932 strains and PLD-negative 2590, ELHA-1 mutant strains. *Escherichia coli* OP-50 non-pathogenic bacteria was used as negative control

were observed since the first day post-infection, independent of DT or PLD production.

Caenorhabditis elegans eggs can be retained and hatch inside the parental body, a process called “worm bagging” due to the creation of a bag of worms. *C. ulcerans* strains tested were capable of inducing worm bagging at different levels: PLD-negative 2590 and PLD-negative ELHA-1 mutant strains induced bagging in the same number ($n = 3$) of dead adult worms, while PLD-positive 210932 control strain induced bagging in an adult worm. PLD-positive BR-AD22 wild-type strain was capable to induce the highest number of bagging phenotype ($n = 14$), including alive adult nematodes ($n = 2$). Additionally, PLD-negative strain 2590 was capable to induce colonization of nematode gut as observed by fluorescence signals using mCherry-labelled bacteria (Fig. 5d).

Star formation was observed post-infection by all strains of *C. ulcerans*. Higher number of worms in each star was observed for PLD-positive BR-AD22 wild-type and PLD-negative ELHA-1 mutant strain that showed the lowest ability of killing nematodes.

Interestingly, for PLD-negative strain 2590 and PLD-positive 210932 control strain, independent of DT production, some of the exposed worms developed cyst-like structures in the vulvar-uterus region, an unusual mode of infection on the nematode host, suggesting infection of the uterus by *C. ulcerans*



Fig. 5 Morphological changes of *C. Caenorhabditis elegans* in response to *Corynebacterium ulcerans* infection. **a-b** Dar phenotype; **c** cyst-like structures in the vulvar-uterus region; **d** worm bugging; **e-g** star formation

(Fig. 5c). This event during exposure of *C. elegans* by this bacterial pathogen may also contribute to produce an increase in host mortality rate.

Discussion

Presently, detection of a PLD-negative *C. ulcerans* from a concurrent case of diphtheria and IM was first documented in Brazilian Northeastern region. Data

highlighted that *C. ulcerans* should be included in the group of harmful pathogens that can be found disseminated and transmitted in urban areas of different Brazilian regions as well as in other South American countries (WHO 2018).

Making an accurate diagnosis is especially difficult in cases of concurrent diphtheria and IM. These facts may explain the small number of previous reported cases available in the medical literature (Mattos-Guaraldi et al. 2011). The adequacy of the protocols for microbiological diagnosis implemented in public and private-laboratories may successfully provide identification of potentially toxigenic corynebacterial species. Present findings emphasised the efficacy of the following tests used for the identification of diphtheria pathogens, including *C. ulcerans*: DNase screening test, MALDI-TOF and mPCR for simultaneous identification and toxigenicity.

Patients who have probable or confirmed diphtheria are eligible to serotherapy against DT (diphtheria antitoxin-DAT) and classically recommended antibiotics (penicillin G or erythromycin) should be initiated immediately without waiting for bacteriological confirmation (Mattos-Guaraldi et al. 2011). Clindamycin was formerly considered as an alternative in the treatment of the carrier of diphtheria bacilli (Pereira et al. 2008). The increasing problems with multidrug resistance (MDR) in relation to *Corynebacterium* spp. are examples of challenges confronting many countries (Mattos-Guaraldi et al. 2014). Brazilian *C. diphtheriae* strains were evaluated for their susceptibility to 31 antibacterial drugs and resistance to penicillin G was found in 14.8% of these strains, and 4.2% showed decreased susceptibility to erythromycin (Pereira et al. 2008). In a previous study, that first described *C. ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area (Brazil), this pathogen showed moderate susceptibility to penicillin G and clindamycin (Mattos-Guaraldi et al. 2008). In Japan, several ($n = 39$) *C. ulcerans* dog strains showed resistance or decreased sensitivity to clindamycin (Katsukawa et al. 2012). In this study, resistance to both penicillin and clindamycin was also demonstrated for PLD-negative *C. ulcerans* strain 2590. Therefore, data are of value to human and veterinary practitioners and suggest that some concern exists regarding the use of classically recommended

antibiotics for cases of infection by *C. diphtheriae* as well as for *C. ulcerans*.

Clinical signs of diphtheria by *C. ulcerans* strain 2590 and IM included presence of a grayish-white membrane, “bull neck” and signs of systemic toxicity. However, mPCR gave negative results for *tox* gene coding for DT. Although the production of PLD was not demonstrated by the CAMP test, the presence of *pld* gene sequence was detected by PCR. The fact that *C. ulcerans* isolated from a patient presenting clinical signs of diphtheria were characterised as non-producer of DT and PLD confirms that other factors involvement in virulence mechanisms of this pathogen need further investigation. Previous genomic comparative analyses of *C. ulcerans* strains showed genes encoding other candidate virulence factors like ribosome-binding protein, serine-protease, neuraminidase H, endoglycosidase E, and subunits of adhesive pili of the SpaDEF type (Trost et al. 2011). New comparative studies are necessary to investigate the presence of afore mentioned genes in strain 2590 genome.

Despite rising numbers of infections and potentially fatal outcomes, data on the colonization of human mucosal surfaces and tissues are lacking up to now. Previous studies showed the ability of PLD-positive *C. ulcerans* strains to bind to plasmatic and tissue matrix proteins—Fbg, Fn and type I collagen—at varied levels (Simpson-Louredo et al. 2014). PLD-positive *C. ulcerans* strains showed a higher arthritogenic and mortality potential when compared to *C. diphtheriae* strains during an in vivo experimental infection in mice (Dias et al. 2011b). PLD-positive and DT-negative *C. ulcerans* BR-AD22 (dog) and 809 (human) strains were found able to interact and survive within human epithelial (Detroit 562 and HeLa) cell lines. In the same way, mutant strains of DIP0733 homolog CULC22_00609 and PLD-negative (ELHA-3 and ELHA-1) generated from BR-AD22 wild-type strain also expressed the ability to interact and survive within Detroit 562 and HeLa cell lines (Hacker et al. 2015).

Previous studies described *C. elegans* as an invertebrate tractable model for cost-effective and rapid assessment of virulence that often serves as an oral infection route model of human and animal potentially toxigenic pathogens as *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* (Ott et al. 2012). In contrast to the nonpathogenic *Corynebacterium glutamicum* and *E. coli* OP50, pathogenic corynebacteria were able

to colonize *C. elegans* in a strain-specific manner. In this case, the adhesion rates of BR-AD22 wild type and ELHA-1 *pld* mutant were identical (Ott et al. 2012).

At present, experiments dealing with *C. elegans* survival in response to infection by diverse PLD-positive and PLD-negative *C. ulcerans* strains, showed death of nematodes at different levels, although in previous studies ELHA-1 *pld* mutant strain showed identical colonisation behavior compared with the parental strain BR-AD22 in the *C. elegans* system (Ott et al. 2012). Interestingly, the highest levels of mortality of worms were currently observed for PLD-negative *C. ulcerans* strain 2590 (69%) and ELHA-1 mutant strain (67%). PLD-positive *C. ulcerans* BR-AD22 wild type (48%) and 210932 control (44%) strains expressed a lower ability of leading death of nematodes, independent of DT production. However, both PLD-positive and PLD-negative *C. ulcerans* strains were found unable to kill 100% of worms during assessed time of experiments.

It is beneficial for *C. elegans* to avoid pathogenic bacteria as demonstrated with *Pseudomonas aeruginosa* (Zou et al. 2013). In order to investigate if *C. elegans* was able to distinguish different pathogenic strains of *Corynebacterium* species, *E. coli* OP50 strain was clearly preferred when tested with *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* strains. However, no preference of *C. elegans* was observed for non-pathogenic *C. glutamicum*, which showed only a minor effect on nematode survival (Zamiri and McEntegar 1972). In the present study, *C. elegans* was capable to escape from *C. ulcerans* strains, independent of PLD and DT production.

Nematodes express a collagenous extracellular matrix called cuticle. Extracellular matrix barriers and inducible cytoprotective genes form successive lines of defense against chemical and microbial environmental stressors. In *C. elegans*, disruption of some cuticle collagen genes activates osmolyte and antimicrobial response genes. Physical damage to the cuticle of nematodes also activates antimicrobial responses. Previous studies demonstrated the effect of knocking down genes required for cuticle and epidermal integrity on diverse cellular stress responses (Dodd et al. 2018). The authors described that disruption of specific bands of collagen, called annular furrows, coactivates detoxification, hyperosmotic, and antimicrobial response genes, but not other stress

responses. Disruption of other cuticle structures and epidermal integrity does not have the same effect. Presently, PLD-positive BR-AD22 and 210932 strains presented higher ability to interact with type I collagen and, as expected, showed lower ability to kill nematodes, possibly due to affinity to collagenous extracellular matrix cuticle of worms. Conversely, PLD-negative 2590 and ELHA-1 PLD mutant strains with lower ability to interact with type I collagen were able to kill a higher percentage of nematodes. Data suggested that bacterial PLD activity may favor interaction of cuticle and inhibition of ingestion of *C. ulcerans* by worms.

In conclusion, this is the first case of concurrent diphtheria by *C. ulcerans* and IM that highlights the relevance of clinical diagnosis of diphtheria in previously immunised individuals, as well as, management and control of diphtheria worldwide. Additional studies concerning mechanisms of virulence of *C. ulcerans* remain necessary. Since *C. pseudotuberculosis* PLD activity may be regulated by a variety of environmental conditions (heat shock, cell density) (McKean et al. 2007), mechanisms of multifactorial nature of *C. ulcerans* PLD expression also need further investigation.

Acknowledgements This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz (PAPES V-FIOCRUZ), Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR-2/UERJ) and Friedrich-Alexander Universität-Erlangen-Nürnberg (FAU).

Author's contribution Conceived of or designed study: Liliane Simpson-Lourêdo, Maria Helena S. Villas Bôas, Ana Luíza Mattos-Guaraldi. Performed research: Liliane Simpson-Lourêdo, Cecília M.F. Silva, Nadja F. Souza, Milena M. Santana. Analysed data: Liliane Simpson-Lourêdo, Raphael Hirata Jr, Andreas Burkovski, Maria Helena S. Villas Bôas, Ana Luíza Mattos-Guaraldi. Contributed new methods or models: Camila A. Antunes, Elena Hacker, Prescilla E. Nagao. Wrote the paper: Liliane Simpson-Lourêdo, Maria Helena S. Villas Bôas, Ana Luíza Mattos-Guaraldi.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The study (CAAE 44674314.3.3001.5091) was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Universitário Pedro Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro. The consent to participate was not required because the investigated isolate was taken as a part of standard care (diagnostic purposes).

References

- Alibi S, Ferjani A, Gaillot O, Marzouk M, Courcol R, Boukadda J (2015) Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathol Biol* 63:153–157
- Antunes CA, Clark L, Wamaske MT et al (2016) *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacterial. *Microbiology* 162:84–93
- Bonmarin I, Guiso N, Le Flèche-Matéos A, Patey O, Patrick AD, Levy-Bruhl D (2009) Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine* 27:4196–4200
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, approved guideline. CLSI document M45. ISBN 1-56238-917-3
- Dias AA, Santos LS, Sabbadini PS et al (2011a) *Corynebacterium ulcerans*: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Rev Saude Publica* 45:1176–1191. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102011000600021>
- Dias AA, Silva FC Jr, Santos LS et al (2011b) Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. *Vet Microbiol* 53:323–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.007>
- Dodd W, Tang L, Lone JC et al (2018) A damage sensor associated with the cuticle coordinates three core environmental stress responses in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 208:1467–1482
- Hacker E, Ott L, Hasselt K, Mattos-Guaraldi AL, Tauch A, Burkovski A (2015) Colonization of human epithelial cell lines by *Corynebacterium ulcerans* from human and animal sources. *Microbiology* 161:1582–1589
- Haight K, Holden FA (1982) When infections co-exist: infectious mono and diphtheria. *Can Fam Phys* 28:785–788
- Hodgson AL, Tachedjian M, Corner LA, Radford AJ (1994) Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 62:5275–5280
- Jacob-John T (2008) Resurgence of diphtheria in India in the 21st century. *Indian J Med Res* 128:669–670
- Katsukawa C, Komiyama T, Yamagishi H et al (2012) Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka, Japan. *J Med Microbiol* 61:266–273
- Konrad R, Berger A, Huber I et al (2010) Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Eur Surveill* 15(43):19699

- Konrad S, Hürmendorfer S, Sing A (2015) Possible human-to-human transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clin Microbiol Infect* 21:768–771
- Mattos-Guaraldi AL, Sampaio JL, Santos CS et al (2008) 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* 103:396–400
- Mattos-Guaraldi AL, Damasco PV, Gomes DL et al (2011) Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. *J Med Microbiol* 60:1685–1688
- Mattos-Guaraldi AL, Hirata R Jr, Azevedo VA (2013) *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*—general aspects. In: Burkovski A (ed) *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. Springer, Erlangen, pp 15–27
- McKean SC, Davies JK, Moore RJ (2007) Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology* 153:2203–2211
- McNamara PJ, Cuevas WA, Songer JG (1995) Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene* 14:113–118. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00002-N](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00002-N)
- Ott L, McKenzie A, Baltazar MT et al (2012) Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:413–421
- Pacheco LG, Pena RR, Castro TL et al (2007) Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J Med Microbiol* 56:480–486
- Pereira GA, Pimenta FP, Santos FR et al (2008) Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:507–510
- Perkins S, Cordery R, Nixon G et al (2010) Investigations and control measures following a non-travel-associated case of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*, London, United Kingdom, December 2009–January 2010. *Euro Surveill* 15:19544. <https://doi.org/10.2807/ese.15.16.19544-en>
- Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA et al (2008) DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* 46:307–311
- Simpson-Louredo L, Ramos JN, Peixoto RS (2014) *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:343–352
- Torres LCF, Ribeiro D, Hirata R Jr et al (2013) Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:272–279
- Trost E, Arwa Al-Dilaimi A, Papavasiliou P et al (2011) Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genom* 12:383
- Wagner KS, White JM, Lucenko I et al (2012) Diphtheriae in the postepidemic period, Europe, 2000–2009. *Emerg Infect Dis* 18:217–225
- World Health Organization (WHO) (2018) Diphtheria reported cases. http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tincidence/diphtheria.html. Accessed 01 Sept 2018
- Yasuda I, Matsuyama H, Ishifuji T et al (2018) Severe pneumonia caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection, Japan. *Emerg Infect Dis* 24:588–591
- Zakikhany K, Efstratiou A (2012) Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol* 7:595–607
- Zamiri I, McIntegar MGT (1972) The sensitivity of diphtheria bacilli to eight antibiotics. *J Clin Path* 25:716–717
- Zou C-G, Tu Q, Niu J, Ji X-L, Zhang K-Q (2013) The DAF-16/FOXO transcription factor functions as a regulator of epidermal innate immunity. *PLoS Pathog* 9:e1003660. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003660>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

APÊNDICE B – TRABALHO APRESENTADO RELACIONADO DIRETAMENTE COM A TESE DE DOUTORADO



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium ulcerans* and influence of phospholipase D and diphtheria exotoxins: a comprehensive study in mice

Simpson-Loureiro^{1,2,3}, L; Vianna, VG¹; Azevedo, C A^{1,3}; Souza, C¹; Bravo, SB²; Dias, AA²; Hirata Jr, R¹; Villas Boas, MHS²; Burkovski, A³; Mattos-Guaraldi, AL¹

Institutions: 1-Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2-Fundação Oswaldo Cruz; 3-Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg; 4-Universidade Federal Fluminense

Introduction

Diphtheria of zoonotic nature and extrapharyngeal infections caused by *Corynebacterium ulcerans* have increasing in developing and industrialized countries (2,4,7). In the past years, this disease was restricted to dairy cattle contact and consumption of unpasteurized dairy products, thus it was identified like *C. ulcerans* reservoir, as dogs and cats (2). This pathogen produces phospholipase D (PLD), a sphingomyelinase with demonecrotic properties; moreover, it is capable to produce diphtheria toxin (DT). The role of PLD in the mechanisms that *C. ulcerans* uses to cross host barriers and get access to deeper tissues need further investigation. Previous studies verified binding of *C. ulcerans* to extracellular matrix proteins, interaction with epithelial cells and macrophages and induction of arthritis in mice (3,4,5). This assay was carried out in order to observe effects of PLD in *C. ulcerans* of distinct strains (Tab. 1) in blood cells considering quantitative and qualitative variations in murine haematological profiles.

Results

- * In mice: only ELHA-1 did not produce skin lesion on the injection local. One mouse injected with 210932 strain died.
- * Total number and relative proportions of red blood cells (RBC) and the percentage of hemoglobin indicated a significant change (50% reduction) only for DT-positive 210932 strain.
- * Red blood cell rouleaux formation was observed for all *C. ulcerans* tested, except PLD-negative mutant ELHA1.
- * Anisocytosis with normocytosis was observed for 210932, BR-AD22 and PLD-negative mutant ELHA1.
- * Leukocytosis was also observed independent of DT and PLD production. Formation of neutrophil toxic granulation was only shown for the DT/ PLD-positive 210932 strain.
- * *C. ulcerans*-platelet interaction and aggregation induced at different levels by all strains tested related to PLD and DT production.

Methods



Blood Counting: Sysmex® – Poch 100 IV Automated Haematological Veterinary Counter

<i>Corynebacterium ulcerans</i> strains used in this study				
Strain	Host	plf gene	tox gene	Reverse CAMP
2590	Human	+	-	-
210932	Human	+	+	+
BR-AD22	Dog	+	-	+
ELHA1- <i>plf</i> mutant	Dog	disrupted	+	-

Table 1. *C. ulcerans* strains according to the host, *plf* and *tox* genes and reverse CAMP

References

- Dias AASD, Silva FC Jr, Pereira GA, Sousa MC, Camello TCS, Damasceno JA, Pacheco LGC, Miyoshi A, Azevedo VA, Hirata R Jr, Villas Boas MHS, Mattos-Guaraldi LA. 2010. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an Animal Shelter in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary and Zoonotic Diseases* 10(8): 743-748.
- Dias AASD, Santos LS, Sabbadini PS, Santos CS, Silva FC Jr, Nascedo F, Nagao PE, Villas Boas MHS, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. 2011a. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Rev Saúde Pública* 45: 1176-1191.
- Dias AASD, Silva FC Jr, Santos LS, Ribeiro-Carvalho MM, Sabbadini PS, Santos CS, Filardy AA, Miyoshi A, Azevedo VA, Hirata R Jr, Villas Boas MHS, Mattos-Guaraldi AL. 2011b. Strain-dependent anthraxigenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. *Vir Microbiol* 15 (4): 323-323.
- Hacker E, Hensel B, Mattos-Guaraldi AL, Tauch A, Burkovski A. 2015. Colonization of human epithelial cell lines by *Corynebacterium ulcerans* from human and animal sources. *Microbiology* 151(8): 1582-1591.
- Simpson-Loureiro L, Ramoz JN, Peleto RS, Santos LS, Antunes CA, Ladeira EM, Santos CS, Vieira VV, Villas Boas MHS, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. 2014. *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: flagellin, fibronectin and collagen binding, antimicrobial and PFGE profiles. *2014. Antonie van Leeuwenhoek*, 105 (2): 343-352.
- Vianna MG, Benedito L, Mariani DC, Rocha FS, Boas FC, Fialador JL, Pereira JL, Quental JA, Lacer CA, Carvalho AF, Silva A, Soares SCB, Figueiredo HC, Azevedo V, Guimarães LC. 2014. Genomes sequence of *Corynebacterium ulcerans* strain 210932. *Genome Ann* 2(6): e01233-14.
- Zakharov K, Ekström A. 2012. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol* 7: 595-607.

Financial Support



Strain	WBC/ $\times 10^3/\mu\text{L}$	RBC/ $10^{12}/\mu\text{L}$	Platelet/ $10^9/\mu\text{L}$	Neutrophil %	Lympho %	Mono %	Baso %	Eosin %	Observation
210932	13,100	8.78	1,197	56	32	12	0	0	Anisocytosis, polychromasia, neutrophilic leukocytosis, relative lymphopenia and monocytosis
210932	10,800	4.65	588	15	79	4	0	2	Anisocytosis (++), polychromasia, rouleaux formation (++), rare acantocytes, platelet aggregation (+++), leukocytosis, neutrophil toxic granulation
22	18,700	6.9	65	43	47	10	0	0	Anisocytosis, platelet aggregation (++), neutrophilic leukocytosis
22	13,100	6.13	542	56	44	0	0	0	Rouleaux formation (+++), platelet aggregation (+++), neutrophilic leukocytosis, relative lymphopenia
22	9,900	5.74	719	23	73	2	0	2	Polychromasia, rare acantocytes, platelet aggregation (+)
2590	12,600	7.29	883	18	82	0	0	1	Rouleaux formation (++), platelet aggregation(++), neutrophilic leukocytosis
2590	8,600	7.29	1,074	17	79	2	0	2	Platelet aggregation (++)
2590	6,100	8.46	1,262	16	77	5	0	2	Platelet aggregation (+)
Elha1	10,000	9.13	1,411	23	71	4	0	2	Anisocytosis, polychromasia, neutrophilic leukocytosis
Elha1	7,400	7.07	961	8	90	2	0	0	Reactive lymphocyte (+), platelet aggregation (+++)
Elha1	9,400	6.75	994	8	90	1	0	0	Reactive lymphocyte (+), platelet aggregation (+++)
Control	9,350	8.05	831	14	83	5	0	0	Platelet aggregation (++)

Table 2. Blood cell counting and morphological cell changes. (+) few; (++) moderate; (+++) intense

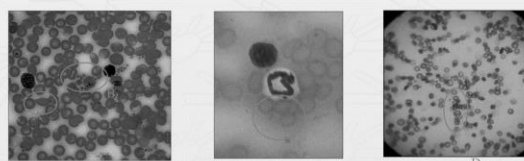


Figure 2. (A) Acantocyte (B) Platelet Aggregate

(C) Neutrophil toxic granulation

(D) Red blood cell rouleaux formation

Conclusions

* Only ELHA *plf*-mutant did not induce red blood cell rouleaux formation that can restrict the flow of blood throughout the host body causing systemic effects in the earlier stages of infection.

* Anisocytosis with normocytosis that may denote early iron deficiency were present for all strains, independent of PLD or DT production as well as platelet aggregation that contributes to blood flow reduction.

* Leukocytosis, frequently a sign of an inflammatory response and neutrophil toxic granulation, commonly found in patients with sepsis, confirm the capability of *C. ulcerans* in generate infection and systemic damage in multiple sites in addition to respiratory system. This feature were showed for all strains.

* In summary, PLD production is important to establish the infection in local and systemic sites, but DT production enhances *C. ulcerans* virulence.

APÊNDICE C - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS PUBLICADOS

Microbiology (2016), 162, 84–93

DOI 10.1099/mic.0.000201

Correspondence
Andreas Burkovski
andreas.burkovski@fau.de

Caenorhabditis elegans star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria

Camila Azevedo Antunes,^{1,2,3} Laura Clark,⁴ Marie-Therès Wanuske,¹ Elena Hacker,¹ Lisa Ott,¹ Liliane Simpson-Louredo,³ Maria das Gracas de Luna,³ Raphael Hirata Jr.,³ Ana Luíza Mattos-Guaraldi,³ Jonathan Hodgkin⁴ and Andreas Burkovski¹

¹Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford, UK

MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE

Peixoto *et al.*, *Microbiology* 2017;163:692–701

DOI 10.1099/mic.0.000467



Functional characterization of the collagen-binding protein DIP2093 and its influence on host–pathogen interaction and arthritogenic potential of *Corynebacterium diphtheriae*

Renata Stavracakis Peixoto,^{1,2,3} Camila Azevedo Antunes,^{1,3} Liliane Simpson Lourêdo,^{3,4} Vanilda Gonçalves Viana,³ Cintia Silva dos Santos,³ Jemima Fuentes Ribeiro da Silva,⁵ Raphael Hirata Jr.,³ Elena Hacker,¹ Ana Luíza Mattos-Guaraldi^{2,3} and Andreas Burkovski^{1,*}

ORIGINAL ARTICLE

Genomic analyses reveal two distinct lineages of *Corynebacterium ulcerans* strains

R. Subedi¹, V. Kolodkina², I. C. Sutcliffe¹, L. Simpson-Louredo³, R. Hirata, Jr.³, L. Titov², A. L. Mattos-Guaraldi³, A. Burkovski⁴ and V. Sangal¹

1) Faculty of Health and Life Sciences, Northumbria University, Newcastle upon Tyne, England, UK, 2) Republican Research and Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus, 3) Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance-LDCIC, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil and 4) Mikrobiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Germany

APÊNDICE D - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS EM REVISÃO

Antonie van Leeuwenhoek

Corynebacterium striatum exerts virulence potential in Caenorhabditis elegans nematodes

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ANTO-D-19-00041
Full Title:	Corynebacterium striatum exerts virulence potential in Caenorhabditis elegans nematodes
Article Type:	Original Article
Keywords:	Corynebacterium striatum; Caenorhabditis elegans; virulence; multiresistance
Corresponding Author:	Ana Luíza de Mattos Guaraldi, Ph.D. Universidade do Estado do Rio de Janeiro Faculdade de Ciências Médicas Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade do Estado do Rio de Janeiro Faculdade de Ciências Médicas
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Cassius Souza, Master
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Cassius Souza, Master Liliane Simpson-Louredo, Master

Journal of Immunology Research

Pathological profiles with systemic infections by Panton-Valentine-positive, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in a murine model

Giorgio Silva-Santana^{1,4,6,7*}, Fábio Aguiar-Alves¹, Kátia Calvi Lenzi-Almeida^{1,5}, Vânia Gloria Silami Lopes¹, Licínio Esmeraldo da Silva^{1,3}, Raphael Hirata Júnior⁶, Vanilda Gonçalves Viana⁶, Liliane Simpson-Lourêdo⁶, Ana Cristina Nunes Escaleira⁶, Juliana da Costa Gerth², Nádia Regina Pereira Almosny², Aline Moreira de Souza², Ana Luíza Mattos-Guaraldi^{4,6,7}.