



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Eliane Cristine da Silva

Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium spp.* isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em hospital terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

Eliane Cristine da Silva

Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium spp.* isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em hospital terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadores: Prof.^a Dra. Ana Luiza Mattos Guaraldi

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S586 Silva, Eliane Cristine da
Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium spp.* isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em hospital terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro / Eliane Cristine da Silva. – 2018.
135 f.

Orientadores: Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Profª. Drª. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

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

1. *Corynebacterium* - Teses. 2. Bacilos Gram-positivos 3. Hemocultura. 4. Fator de virulência - Teses. 5. Biofilmes – Teses. 6. Resistência a antimicrobianos . I. Hirata Júnior, Raphael. II. Guaraldi, Ana Luíza de Mattos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.852.23

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB/7 - 5302

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

Assinatura

Data

Eliane Cristine da Silva

**Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de
Corynebacterium spp. isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em hospital
terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área
de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 07 de junho de 2018.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

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

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

Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant’Anna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Fátima Napoleão
Hospital Universitário Pedro Ernesto - HUPE

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Martins
Instituto Nacional do Câncer - INCA

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivo e Silvia, por todo amor contido nos ensinamentos de honestidade e retidão e por terem fornecido todo o suporte para que eu trilhasse os caminhos do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por absolutamente tudo.

Aos meus pais, Ivo e Silvia, que com muita luta e sacrifício, me proporcionaram a possibilidade de estudar.

Aos meus filhos, Felipe e Vinícius, amores incondicionais que me inspiram ir à luta e ultrapassar todas as barreiras.

À minha irmã Ana Paula, que com seu otimismo sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida.

À Professora Dra. Ana Luíza Mattos-Guaraldi, pelos ensinamentos e pelo exemplo de força e obstinação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raphael Hirata, que mesmo dotado da genialidade dos grandes cientistas, é capaz de transmitir aos seus alunos o conhecimento sem reservas, com toda humildade, paciência e dedicação, traços de um ser humano ímpar.

À Prof^ª. Dra. Monica Cristina de Souza, pelos ensinamentos essenciais no campo do diagnóstico microbiológico.

À Prof^ª Dra. Cíntia Santos, pela ajuda nas várias etapas desta pesquisa e pelas inúmeras horas dedicadas à revisão. Sua participação foi imprescindível nesta conquista.

A todos os colegas do laboratório 3, em especial Yuri, Liliane, Cassius, Dryelle, Guiherme, Vanilda, Beth, Louise, Lincoln, Felipe, Andrezza, Renata e Maria, pelo agradável convívio, baseado na cooperação, amizade e respeito.

Aos meus colegas da CCIH do Hospital Central do Exército, Cel Márcio, TC Coelho, Enfermeira Wilma e Tenente Freitas, pela compreensão da minha ausência e pelo apoio irrestrito para que eu pudesse realizar este trabalho.

A equipe do Laboratório Clínico do Hospital Central do Exército, em especial, Tenente Daniele, Sgt Janaina Mendes e Sgt Felippo, pelo auxílio prestado.

Ao Exército Brasileiro, instituição à qual tenho orgulho de pertencer, por viabilizar os horários e permitir que este Doutorado fosse concluído.

Às instituições CAPES, FAPERJ, CNPq, FIOCRUZ e UEZO, pelo apoio à realização desta pesquisa.

À todos aqueles que de forma direta ou indireta, colaboraram nesta conquista.

“Nada te perturbe, nada te amedronte. Tudo passa, a paciência tudo alcança. A quem tem Deus nada falta. Só Deus basta!”

Santa Teresa D'Avila

RESUMO

SILVA, Eliane Cristine da. **Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium spp.* isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em hospital terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro.** 2018, 135 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2018.

Pelo fato das corinebactérias constituírem parte da microbiota comensal de seres humanos e animais, o seu isolamento a partir de amostras clínicas tem sido negligenciado por profissionais de saúde sendo considerados como contaminantes. O presente estudo desenvolvido em um hospital terciário da cidade do Rio de Janeiro, avaliou amostras de *Corynebacterium spp.* e outros bacilos Gram positivos de importância clínica, isolados de 548 hemoculturas de pacientes internados em diversos setores, no período de fevereiro a dezembro de 2015. Foram identificadas através do MALDI-TOF (*Matrix Assisted laser Desorption Ionization – Time of Flight*) as seguintes espécies: *Corynebacterium striatum* (n=07), *Corynebacterium amycolatum* (n=03), *Corynebacterium aurimucosum* (n=01), *Corynebacterium minutissimum* (n=01), *Brevibacterium ravespurgense* (n=01), *Dietzia maris* (n=01), *Listeria monocytogenes* (n=2), *Tsukamurella paurometabola* (n=01). A disseminação de *C. striatum* foi investigada utilizando-se a técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE) demonstrando a prevalência de um único pulsotipo designado como IC devido à similaridade observada com amostras isoladas anteriormente em um hospital universitário do Rio de Janeiro. As amostras de *C. striatum* e *C. amycolatum* foram resistentes a múltiplos antimicrobianos, sendo que as amostras de *C. striatum* apresentaram sensibilidade somente à vancomicina, linezolida e tetraciclina, dentre os 24 antimicrobianos testados. Todas as amostras de *C. striatum* e *C. amycolatum* foram capazes de produzir biofilme sobre substratos abióticos hidrofílicos e hidrofóbicos e demonstraram a capacidade de aderir, sobreviver e persistir no interior de células epiteliais humanas (A549) em níveis variados. Adicionalmente, nos ensaios com modelos *in vivo*, *C. striatum* e *C. amycolatum* foram capazes de promover leucocitose, linfocitose, neutrofilia e monocitose absolutas em camundongos, assim como de promover mecanismos de patogenicidade e letalidade para o helminto *Caenorhabditis elegans*. Tais atributos corroboram para a patogenicidade de *C. striatum* e *C. amycolatum* e podem subsidiar o desenvolvimento de estratégias para a prevenção, monitoramento e o controle das infecções por estes agentes. Desta forma, *C. striatum* e *C. amycolatum* devem ser considerados riscos potenciais para pacientes hospitalizados e medidas de vigilância devem ser tomadas para prevenir, monitorar e controlar tais infecções nos ambientes nosocomiais. Estudos adicionais acerca desses e de outros atributos de virulência e da sua relevância para a patogenia de corinebactérias permanecem necessários, na tentativa de minimizar o envolvimento destes patógenos como agentes etiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

Palavras-chave: *Corynebacterium striatum*. *Corynebacterium amycolatum*. Hemocultura.

ABSTRACT

SILVA, Eliane Cristine da. **Characterization of clinical-epidemiological and microbiological aspects of *Corynebacterium* spp. isolated from hematogenous infections of patients attended at a tertiary hospital in the metropolitan region of Rio de Janeiro.** 2018, 135 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2018.

Corynebacteria are part of the commensal microbiota of humans and animals, and their isolation from clinical samples has been neglected by clinicians, since those microorganisms is usually considered as contaminants. The present study was conducted in a tertiary hospital in the city of Rio de Janeiro, and clinical strains of *Corynebacterium* spp. and other Gram positive bacilli of clinical importance, isolated from a total of 548 blood cultures of hospitalized patients in several hospital sections, from February to December 2015. The following species were characterized by the use of MALDI-TOF (*Matrix Assisted laser Desorption Ionization – Time of Flight*): *Corynebacterium striatum* (n=07), *Corynebacterium amycolatum* (n=03), *Corynebacterium aurimucosum* (n=01), *Corynebacterium minutissimum* (n=01), *Brevibacterium ravespurgense* (n=1), *Dietzia maris* (n=01), *Listeria monocytogenes* (n=02), *Tsukamurella paurometabola* (n=01). The dissemination of *C. striatum* was investigated using a Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique demonstrating the prevalence of a single clone named pulsotype IC, related to strains previously isolated in a hospital from Rio de Janeiro. *C. striatum* and *C. amycolatum* strains were resistant to multiple antimicrobials, and among the 24 antimicrobials tested, the *C. striatum* samples showed sensitivity only to vancomycin, linezolid and tetracycline. Both *C. striatum* and *C. amycolatum* strains produced biofilm at abiotic hydrophobic and hydrophilic surfaces. In addition, the strains were capable to adhere, survive and persist within type II pneumocytes (A549). In view of *in vivo* models, these pathogens were able to cause hematological changes in mice, as well as to promote mechanisms of pathogenicity and lethality to *Caenorhabditis elegans* helminth. These features corroborate the pathogenicity of *C. striatum* and *C. amycolatum* and their knowledge may support the development of strategies for the prevention, monitoring and control of infections by these agents in nosocomial environment. Thus, *C. striatum* and *C. amycolatum* should be considered as potential risk factors for hematogenous infections in hospitalized patients and surveillance measures should be taken to avoid preventing, monitoring and controlling such infections in nosocomial setting. Further studies on these and other virulence attributes and their relevance to the pathogenesis of corynebacteria remain necessary to minimize the involvement of these pathogens as etiological agents .

Key words: *Corynebacterium striatum*. *Corynebacterium amycolatum*. Blood culture.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS

A549	Célula de carcinoma de pulmão
AA	Aderência Agregativa
ANC	<i>Anaerobe and Corynebacterium</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACT	Ágar Chocolate Telurito
ADN	Ácido Dexorribonucleico
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AM	Ácido Micólico
API [®] Coryne	Sistema de identificação semi-automático ou automático de corinebactérias
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAR	Bacilos Álcool Ácido Resistentes
BGP	Bacilos Gram-positivos
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNS	Coagulase- Negative <i>Staphylococcus</i>
CTA	<i>Cystine Tryptone Agar</i>
CVC	Cateter Venoso Central
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM/F12	Meio mínimo essencial modificado por Dulbecco suplementado com F12
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxirribonuclease
DO	Densidade Óptica
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ESC	Esculina
ESBL	<i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de β -lactamases de espectro estendido
G+C	Guanina + Citosina
GEL	Gelatina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ICS	Infecções de Corrente Sanguínea
Ig	Imunoglobulina

IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRA	Infecção Respiratória Aguda
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecções do Trato Urinário
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LDCIC	Laboratório de Corinebactérias de Importância Clínica
mL	Mililitro
mM	milimolar
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MDR	<i>Multiple Drug Resistant</i>
MDS	<i>Multiple Drug Sensible</i>
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
NIT	Nitrato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAL	Fosfatase Alcalina
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PG	Peptideoglicano
PyrA	Pirrolidonil arilamidase
PYZ	Pirazinamidase
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
rpoB	Gene codificador da subunidade beta da RNA polimerase
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SW	<i>Swiss Webster</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>

UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VITEK 2	Sistema automatizado de identificação microbiana (ID) e teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA)
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
±	Mais ou menos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas na formação do biofilme	38
Figura 2 –	Padrões de aderência na formação de biofilme em tubos de vidro	53
Figura 3 –	Ensaio com camundongos Swiss Webster	61
Figura 4 –	Testes fenotípicos e crescimento em meios de cultivo de <i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i> isolados de hemoculturas de pacientes internados em Hospital Terciário ..	65
Figura 5 –	Eletroforese em campo pulsado de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i>	69
Figura 6 –	Padrões de formação de biofilme em vidro de amostras de <i>C. striatum</i> e <i>C.</i> <i>amycolatum</i>	70
Figura 7 –	Análise ultraestrutural do biofilme formado através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	75
Figura 8 –	Análise da produção de <i>slime</i> pelo método do Agar vermelho do Congo	76
Figura 9 –	Análise qualitativa do biofilme por coloração com Safranina e Comassie blue .	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Produção de biofilme em poliestireno	71
Gráfico 2 –	Análise quantitativa da produção de biofilme em lamínulas de Thermanox	72
Gráfico 3 –	Influência do ferro sobre a produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno)	73
Gráfico 4 –	Interação bacteriana com células epiteliais respiratórias humanas (A549)	80
Gráfico 5 –	Viabilidade intracelular de corinebactérias em pneumócitos (A549)	81
Gráfico 6 –	Análise quantitativa da persistência bacteriana em pneumócitos (A549)	82
Gráfico 7 –	Interação bacteriana com modelo helminto	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Aspectos clínico-epidemiológicos de 15 pacientes, internados em Hospital Terciário do Rio de Janeiro, de fevereiro a dezembro de 2015, com hemoculturas positivas para bacilos Gram-positivos (n=15)	64
Quadro 2-	Identificação das amostras de bacilos Gram-positivos isoladas de hemoculturas de pacientes internados em Hospital Terciário do Rio de Janeiro, de fevereiro a dezembro de 2015, através dos métodos convencionais, Sistema semi-automatizado Api Corine e MALDI-TOF a partir de culturas mono e polimicrobianas (n=19)	66
Quadro 3-	Perfis de susceptibilidade de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> e <i>Corynebacterium amycolatum</i> aos agentes antimicrobianos avaliados pelo teste de difusão em disco (n=10)	68

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	O gênero <i>Corynebacterium</i>	20
1.2	Infecções por <i>Corynebacterium spp.</i>	21
1.2.1	<u><i>Corynebacterium striatum</i></u>	26
1.2.2	<u><i>Corynebacterium amycolatum</i></u>	30
1.3	Fatores de risco em pacientes imunossuprimidos e infecções hospitalares	33
1.4	Biofilme Bacteriano	36
1.4.1	<u>Biofilmes e infecções associadas a cateteres vasculares</u>	40
1.4.2	<u><i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental de infecção</u>	42
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1	Coleta de dados	46
3.2	Considerações éticas	46
3.3	Origem, isolamento e estocagem dos micro-organismos	47
3.4	Identificação através de provas bioquímicas convencionais	48
3.5	Identificação através do sistema semi-automatizado API Coryne	48
3.6	Identificação através da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF	49
3.7	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos	50
3.8	Caracterização Genotípica por PFGE	50
3.9	Caracterização da Virulência	52
3.9.1	<u>Avaliação das propriedades adesivas e da formação de biofilme</u>	52
3.9.1.1	Preparo das suspensões bacterianas	52
3.9.1.2	Análise qualitativa da produção de biofilme em vidro	52
3.9.1.3	Análise quantitativa da produção de biofilme em vidro	53
3.9.2	<u>Determinação do padrão de aderência à superfície de poliestireno</u>	54
3.9.2.1	Análise semiquantitativa da formação de biofilme em poliestireno	54
3.9.2.2	Análise quantitativa da produção de biofilme em poliestireno	55

3.9.2.3	Análise ultraestrutural do biofilme formado através de ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	55
3.9.2.4	Análise da composição do biofilme formado sobre superfícies abióticas diversas através de colorações específicas	56
3.9.2.5	Verificação da natureza glicídica do biofilme formado (produção de <i>slime</i>) utilizando meio Vermelho do Congo	56
3.10	Análise estatística	57
3.11	Ensaio de interação celular	57
3.11.1	<u>Cultivo e preparo do inóculo bacteriano</u>	57
3.11.2	<u>Cultivo das células eucarióticas</u>	58
3.11.2.1	Cultivo e manutenção de pneumócitos humanos (A549)	58
3.11.2.2	Ensaio de interação com pneumócitos humanos (A549)	58
3.12	Ensaio com modelos <i>in vivo</i>	59
3.12.1	<u><i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de infecção <i>in vivo</i></u>	59
3.12.2	<u>Inoculação de amostras bacterianas em camundongos</u>	60
4	RESULTADOS	62
4.1	Aspectos clínico-epidemiológicos das infecções por BGP	62
4.2	Caracterização fenotípica	62
4.2.1	<u>Testes Bioquímicos Convencionais, Sistema APICoryne e MALDI-TOF</u>	62
4.2.2	<u>Análise dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos</u>	67
4.3	Caracterização Genotípica	69
4.3.1	<u>Análise do polimorfismo através de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)</u>	69
4.4	Caracterização da Virulência	70
4.4.1	<u>Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico (vidro)</u>	70
4.4.2	<u>Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno)</u>	71
4.4.3	<u>Influência da privação de ferro sobre a produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno)</u>	73
4.4.4	<u>Análise ultraestrutural do biofilme formado através de Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</u>	74
4.4.5	<u>Análise da natureza polissacarídica do biofilme através da produção de <i>slime</i> em meio Vermelho do Congo</u>	76
4.4.6	<u>Análise qualitativa da composição química do biofilme através da coloração com Safranina e Comassie blue</u>	77

4.4.7	<u>Interação com superfícies bióticas</u>	79
4.4.7.1	Interação, viabilidade e persistência bacteriana em células epiteliais respiratórias humanas (A 549))	79
4.4.7.2	Interação bacteriana com modelo helminto (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	82
4.4.7.3	Infecção experimental utilizando o modelo murino (camundongos Swiss Webster)	84
5	DISCUSSÃO	85
	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXO A - Aprovação pela Comissão de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro	132
	ANEXO B - Aprovação Técnica de Projeto de Pesquisa para realização junto ao Centro de Pesquisas do Serviço de Saúde do Exército	133
	ANEXO C - Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais	134
	ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	135

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Corynebacterium* estão amplamente distribuídas no ambiente e na microbiota de seres humanos e animais. As espécies de corinebactérias de relevância clínica incluem *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* causas primárias da difteria, e as corinebactérias não diftéricas, que fazem parte da microbiota normal da pele e das membranas mucosas. As corinebactérias não diftéricas têm sido frequentemente descartadas como contaminantes quando isoladas de materiais clínicos. Entretanto, atualmente, o papel destas bactérias na doença clínica está sendo mais claramente estabelecido (Alibi *et al.* 2017)

Atualmente, o gênero *Corynebacterium* compreende mais de 115 espécies válidas descritas (Euzéby, 2014) e pouco mais de 50 espécies aparecem ocasionalmente ou raramente causando infecções em humanos (Bernard, 2012). As corinebactérias estão distribuídas em uma ampla gama de ambientes ecológicos como solo, esgoto e superfície de plantas, sendo que algumas delas são patógenos para animais e para o homem. A espécie mais importante do gênero é o patógeno humano *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria (Janda *et al.*, 1998; Schroder *et al.*, 2012).

Tem ocorrido um aumento significativo no número de publicações relacionadas com a microbiologia clínica das corinebactérias e existem muitas razões para isso: (i) a um grande número de pacientes imunocomprometidos cujo diagnóstico e tratamento tornou-se mais intensivo e invasivo, resultando em melhores condições de crescimento para micro-organismos agressores; (ii) até agora, o potencial patogênico das corinebactérias tinha sido subestimado; e (iii) aumento no interesse pela taxonomia, resultando em reclassificações e novas espécies e gêneros (Funke *et al.*, 1997).

Muitas das espécies de relevância clínica são consideradas como parte da microbiota da pele humana, incluindo *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium jeikeium*, assim como outras espécies lipofílicas, muitas das quais apresentam resistência a múltiplas classes de antimicrobianos e podem causar doença fatal, particularmente em pacientes imunocomprometidos (Bernard *et al.*, 2012).

Corinebactérias são gram-positivas, catalase-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, geralmente bastonetes imóveis. O gênero contém *Corynebacterium diphtheriae* e também corinebactérias não diftéricas, chamadas de difteróides. As corinebactérias não diftéricas (*Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium*

minutissimum, *Corynebacterium xerosis* e *Corynebacterium freneyi*) foram originalmente consideradas como contaminantes. Eles têm sido reportados como patógenos oportunistas emergentes em hospedeiros imunocomprometidos, tais como pacientes com doença renal em estágio terminal, malignidades hematológicas ou doença grave. O reconhecimento de infecções causadas por bactérias corineformes depende do nível de alerta e atenção dos clínicos (Chen *et al.*, 2012)

Corinebactérias não diftéricas, também chamadas de difteróides, são um conjunto bastante diversificado de bactérias. Até agora, o potencial patogênico das corinebactérias tem sido subestimado. Embora frequentemente considerados como contaminantes, estes micro-organismos têm sido associados com doença invasiva, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Espécies como *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium urealyticum* estão sendo relatados com maior frequência nos últimos anos. Estes micro-organismos têm sido implicados ainda, em múltiplas infecções como as de corrente sanguíneas associadas a cateter, endocardites, infecções de válvulas protéticas, meningites, infecções derivadas de neurocirurgia, abscessos cerebrais, peritonites, osteomielites, artrites sépticas, infecções do trato urinário, empiemas e pneumonias (Bishai *et al.* 2008).

As espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium* vêm emergindo como verdadeiros patógenos em processos infecciosos em pacientes imunossuprimidos. Algumas espécies do gênero *Corynebacterium* tais como o *C. jeikeium* e *C. amycolatum* vêm se destacando como agentes etiológicos de infecções graves em pacientes com variados graus de imunossupressão. Contudo, as metodologias usualmente empregadas na maior parte dos laboratórios, descartando os micro-organismos como contaminantes ou limitando o tempo de processamento do material a menos de 48 horas, restringem o isolamento de corinebactérias de importância médica, subestimando sua incidência nos processos infecciosos (Wirsing *et al.*, 1986; Sjöden *et al.*, 1998). Além disso, são poucos os trabalhos que procuraram inferir a participação desses micro-organismos nos processos infecciosos em pacientes portadores de neoplasias submetidos aos diversos procedimentos diagnósticos e terapêuticos. (Telander *et al.*, 1988; Oteo *et al.*, 2001).

Há relatos de surtos nosocomiais graves causados por *Corynebacterium* spp. (Baio *et al.*, 2013; Iaria *et al.*, 2007) e seu potencial patogênico foi comprovado, principalmente devido à imunossupressão e ao uso de dispositivos médicos (Miura *et al.*, 2014; Oliva *et al.*, 2010). Amostras de *Corynebacterium* spp. resistentes à antibióticos, surgem como patógenos oportunistas nosocomiais emergentes em pacientes internados por longos períodos e podem

dar origem a grandes surtos (Fernandez *et al.*, 2013; Verroken *et al.*, 2014). Ainda há pouca informação acerca de infecções de corrente sanguínea causadas por *Corynebacterium* spp., ou sobre as características dos dispositivos relacionados às infecções por causadas por biofilmes de *Corynebacterium* spp. (Benet *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). Estudos acerca das características de amostras *Corynebacterium striatum* multirresistentes, isoladas de hemoculturas de pacientes hospitalizados no Japão, evidenciam sua importância clínica (Qin *et al.*, 2017).

O índice crescente de corinebactérias não diftéricas que apresentam perfil resistente a antimicrobianos tem sido motivo de preocupação, principalmente em pacientes hospitalizados. Patógenos oportunistas podem ter uma variedade de fatores de virulência que facilitem sua ligação às células do hospedeiro e permitir a invasão dos tecidos. Tal fato, respalda a necessidade de pesquisas adicionais sobre o gênero *Corynebacterium* spp., principalmente a sua prevalência em espécimes clínicos, dos mecanismos de resistência adquiridos e da capacidade de aderência e viabilidade intracelular em cultura de células. Em face do conhecimento ainda incipiente acerca do papel das corinebactérias não diftéricas nas infecções nosocomiais, faz-se necessário um estudo mais aprofundado dos aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de infecções hematogênicas de pacientes hospitalizados.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium*, descrito por LEHMANN & NEUMANN (1896), pertence à classe *Actinobacteria* a qual também pertencem às classes *Mycobacterium* e *Nocardia*, sua ordem é *Actinomycetales*, e a família *Corynebacteriaceae*. As corinebactérias possuem parede celular composta por arabinose, galactose, ácido mesodiaminopimérico e cadeias curtas de ácido micólico (aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono); são catalase-positivas, não esporuladas, imóveis e exibem pleomorfismo celular, podendo se apresentar sob as formas cocoides, bacilares, e filamentosas, individualmente, em pares e/ou paliçadas. Algumas espécies apresentam grânulos metacromáticos que são reservas de fosfatos de elevada energia (Collins *et al.*, 1986; Baron *et al.*, 1994; Biberstein *et al.*, 1994; Holt *et al.*, 1994). As corinebactérias (coryne = clava) são bactérias que tendem a ser claviformes quando expostas a meios artificiais de cultura. São não esporuladas, sendo afuniladas, sem flagelos e cápsulas. Formas cocobacilares também podem ser observadas, dependendo das condições e tempo de cultivo. O tamanho pode variar de 2 a 6 µm de comprimento e 0,5 a 1,1 µm de diâmetro. Devido a sua forma de divisão, ângulos agudos são formados conferindo o aspecto de letras chinesas quando visualizadas em um esfregaço corado pelo método de Gram (Janda, 1998, Renom *et al.*, 2007, Chung *et al.*, 2008, Funke; Bernard, 2012; Ramos, 2014).

As espécies *Corynebacterium* e bactérias correlatas tendem a exibir uma forma claviforme ou irregular; embora nem todos os micro-organismos isolados tenham formas irregulares, as denominações “bactérias corineformes” ou “difteroides” são convenientes para o grupo. Essas bactérias apresentam alto conteúdo de guanosina-citosina (GC) e incluem gêneros *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium* e outros. Outros bacilos Gram-positivos não formadores de esporos exibem formas mais regulares e com menor conteúdo de guanosina e citosina. Os gêneros incluem *Listeria* e *Erysipelothrix* (Brooks, 2014).

O gênero *Corynebacterium* pertence à classe *Actinobacteria* e representa um grupo diverso de bactérias Gram-positivas, com um alto conteúdo de G+C no DNA (variando de 51% a 63% mol.). Há evidências de heterogeneidade dentro do gênero, como exemplos, as espécies clinicamente relevantes *Corynebacterium amycolatum* e *Corynebacterium*

kroppenstedtii carecem de ácidos micólicos na parede celular e *Corynebacterium afermentans* e *Corynebacterium auris* possuem acima de 65% de mol. de G+C no DNA (Funke *et al.*, 1997; Khamis *et al.*, 2004; Raoult; La scola, 2004, Funke; Bernard, 2012, Olender, 2012).

Quase todas as espécies de *Corynebacterium* são caracterizadas por uma parede de arquitetura complexa, compreendendo uma camada externa de ácidos micólicos, que é funcionalmente equivalente à membrana externa das bactérias Gram negativas, não somente ao que diz respeito ao seu papel fisiológico como barreira de permeabilidade, mas também como um componente importante da interação patógeno-hospedeiro. Há muito já se sabe que os constituintes da camada de ácido micólico podem ser estimulantes imunológicos e aumentar a eficiência da função dos macrófagos (Indrigo *et al.*, 2003; Burkovski, 2013).

Protusões proteináceas como fimbrias e pili são estruturas fundamentais para a ligação de bactérias a superfícies abióticas e bióticas. Nas corinebactérias, a pili foi descrita primeiramente em *Corynebacterium renale* (Yanagawa *et al.*, 1969). Mais tarde, verificou-se através de análises moleculares detalhadas que o *Corynebacterium diphtheriae* amostra tipo NCTC13129, produzia três tipos diferentes de estrutura de pilus, SpaA-, SpaD-, and SpaH-, que eram polimerizadas por sortases classe C específicas e ligadas covalentemente à superfície celular pela sortase F (Rogers *et al.*, 2011; Ton-that *et al.*, 2004). Além do *C. diphtheriae*, os aglomerados de genes de pilus foram encontrados em inúmeras corinebactérias patogênicas incluindo *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium aurimucosum*, *Corynebacterium glucoronolyticum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium pseudogenitalium*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium tuberculostearicum* e *Corynebacterium urealyticum* (Rogers *et al.*, 2011).

1.2 Infecções por *Corynebacterium* spp.

As bactérias corineformes devem ser consideradas como organismos clinicamente importantes sempre que forem isoladas de culturas puras ou de sítios estéreis ou isoladas repetidamente (Funke, *et al.* 2003).

O significado clínico do isolamento de Bacilos Gram-positivos (BGPs) é altamente dependente do contexto do isolamento da amostra. Assim como para os demais patógenos humanos, mais do que o retrato do crescimento nas placas de Petri de BGPs, o laudo microbiológico deve ser o resultado de uma leitura interpretativa e crítica. O microbiologista

na sua rotina diária, para decidir a importância dos BGPs isolados, deve considerar o potencial patogênico do agente e os dados clínicos do paciente. A comunicação e interação entre o laboratório de microbiologia e o médico é bastante útil (ANVISA, 2013).

A identificação das bactérias corineformes permanece um desafio para a rotina diagnóstica dos laboratórios, devido ao grande número de espécies pertencentes a esse grupo, acrescido da dificuldade de isolamento da maioria desses micro-organismos. Devido ao fato de que quase todos eles são parte da microbiota comensal do corpo humano, é necessária uma análise para estabelecer seu significado clínico. Múltiplos testes são necessários para identificar fidedignamente estes isolados até a espécie correta, muitos dos quais, não são usados na rotina dos laboratórios (Reddy *et al.*, 2012).

A avaliação do significado clínico do isolamento de uma amostra de *Corynebacterium* de espécimes clínicos nem sempre é fácil pelo fato das corinebactérias constituírem parte da microbiota normal da pele e mucosas, logo, o seu isolamento pode ser atribuído a falhas na técnica de coleta da amostra. Em tais casos, não há bacteremia, mas a presença de bactérias contaminantes da pele. Entretanto existem casos em que realmente há bacteremia por bactérias corineformes e nessas situações, hemoculturas positivas não devem ser descartadas. Tais culturas positivas devem ser avaliadas de acordo com critérios específicos. Nesses casos, testes adicionais (mais hemoculturas obtidas, identificação até o nível espécie) e o monitoramento do paciente são necessários. Em particular, doenças concomitantes associadas com vários fatores de risco, aumentam a importância clínica das bactérias corineformes isoladas de hemoculturas (Infantidou *et al.*, 2010; Van der Lelie *et al.*, 1995).

Com a diminuição da transmissão da difteria, as espécies de corinebactérias não-diftéricas assumiram uma maior importância na medicina clínica. O aumento da população de imunocomprometidos e o uso mais comum de dispositivos de acesso intravascular têm contribuído para este fenômeno. Embora a maioria das infecções graves seja atribuída ao *Corynebacterium jeikeium*, outras espécies agora reconhecidas como patógenos incluem *Corynebacterium urealyticum* e *Corynebacterium striatum*, entre outros. Desde sua descrição original, *Corynebacterium minutissimum* era agente causador de eritrasma e raramente associado com doença extracutânea. Em um estudo norte americano, foi reportado um caso de celulite e bacteremia causadas por *C. minutissimum* (Granok *et al.*, 2002).

Atualmente, mais da metade de todas as doenças infecciosas que acometem pacientes com imunossupressão leve envolvem espécies bacterianas encontradas frequentemente no ambiente ou na microbiota normal do corpo. Patógenos oportunistas, incluindo *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* são frequentemente resistentes a agentes

antimicrobianos e não há vacina contra este micro-organismo. *C. pseudodiphtheriticum* tem sido relatado como causador de doença humana, tanto em indivíduos imunocomprometidos como imunocompetentes, apesar do fato de ser rotineiramente considerado um organismo comensal inofensivo da pele e do trato respiratório superior (Ahmed *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1997; Von Gravenitz *et al.*, 1998; Camello *et al.* 2009; Souza *et al.*, 2012). Infecções causadas por este micro-organismo incluem endocardites, pneumonias e broncoatraqueítes, nunca sendo reportado como patógeno da pele. Porém, um estudo descreveu um paciente com uma lesão ulcerativa de pele causada por *C. pseudodiphtheriticum*. O diagnóstico de doença causado por um comensal da pele pode ser negligenciado, mas deve ser considerado em face de achados microbiológicos e histológicos (Hemseley *et al.*, 1999). *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* raramente tem sido isolado de pacientes com infecções do trato respiratório superior e pneumonia. A maioria dos relatos é de infecções adquiridas comunitariamente e ocorrem em pacientes com uma doença de base e imunossupressão. Um estudo francês relata um caso caracterizado por uma pneumonia adquirida no hospital em um paciente debilitado. Revisões de literatura indicam que o *C. pseudodiphtheriticum* deve ser considerado um patógeno emergente (Martaresche *et al.*, 1999).

Corynebacterium spp. com exceção de *Corynebacterium diphtheriae*, são parte da microbiota normal da pele e membranas mucosas e ocorrem como contaminantes comuns em amostras de diagnóstico. Entretanto, os clínicos tendem a considerar esses micro-organismos como contaminantes. No entanto, cada vez mais, esses micro-organismos têm sido reconhecidos como patógenos em pacientes imunocomprometidos (Camello *et al.*, 2003)

Corineformes têm emergido como importantes patógenos causadores de infecções humanas severas em pacientes imunocomprometidos. Entretanto, cada vez mais tem sido percebido que o potencial patogênico das bactérias corineformes está sendo subestimado e não está limitado meramente a esse grupo de pacientes. Estudos relatando o potencial patogênico das bactérias corineformes para indivíduos imunocompetentes provaram que estas estão bem estabelecidas como patógenos. Inúmeras espécies como *C. amycolatum*, *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. matruchotti*, *C. aquaticum*, *C. genitalium* e *C. pseudogenitalium* estão relacionadas com infecções humanas. *C. jeikeium* e *C. urealyticum* são bem estabelecidos como patógenos humanos exibindo resistência a vários antibióticos. Entretanto, relatos acerca da epidemiologia de corineformes de países em desenvolvimento são poucos (Rizvi *et al.*, 2011).

A difteria, causada pelo *Corynebacterium diphtheriae*, representou um grave problema de saúde pública mundial na primeira metade do século XX até seu controle por medidas mais

efetivas de imunização, obtidas, sobretudo pelos países desenvolvidos (Dittman *et al.*, 1997). A partir de 1990, a difteria reemergiu em caráter epidêmico nos países da ex-União Soviética e em outras áreas em que houve uma desorganização socioeconômica e descontinuidade dos programas de vacinação (Mac Gregor *et al.*, 2005). *C. diphtheriae* permaneceu induzindo quadros de difteria de forma endêmica em baixa prevalência nos indivíduos adultos não vacinados ou com baixo nível de anticorpos, em crianças de países tropicais subdesenvolvidos com baixa cobertura vacinal (Mahe *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2002), como também em minorias raciais, homossexuais masculinos (Wilson *et al.*, 1992), usuários de drogas (Millar *et al.*, 1992) e portadores de doenças neoplásicas (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001). Durante a epidemia que envolveu os países da antiga União Soviética, a colonização pelo micro-organismo em lesões de pele, incluindo em úlceras decorrentes de picadas de insetos, associada ao desleixo com as medidas básicas de higiene, foram importantes fatores na transmissibilidade do clone epidêmico através da comunidade (Mac Gregor *et al.*, 2005). A colonização de feridas cutâneas e tumorais pode ser importante fonte na manutenção endêmica da doença. Além disso, as lesões de pele podem possibilitar surtos comunitários e hospitalares por outras espécies de corinebactérias, em associação com *C. diphtheriae* entre pacientes portadores de neoplasias (Wilson *et al.*, 1992; Mahe *et al.*, 2001; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001).

Corynebacterium ulcerans é um patógeno zoonótico que ocasionalmente causa sintomas semelhantes à difteria em humanos. Casos de infecções por *C. ulcerans* têm aumentado nos últimos anos, sendo então reconhecido como um patógeno emergente. No Japão, foi reportado um caso de morte por asfixia devido à pseudomembrana, causada pela toxina diftérica produzida pelo *C. ulcerans*. Trata-se do primeiro caso fatal relatado de infecção por *C. ulcerans* no Japão. Uma amostra de *C. ulcerans* foi obtida do animal de estimação do paciente, sendo idêntica à isolada do paciente e confirmada por sequenciamento do gene rRNA 16S e gene DT, por PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) e por ribotipagem. Concluiu-se que *C. ulcerans* produtor de toxina diftérica (TD) pode ser contraído de um animal de companhia e causar a morte humana caso haja atraso na instituição da terapia adequada (Otsuji *et al.*, 2017).

A partir de meados da década de 1980, o número de casos de difteria de natureza zoonótica causada pelo *C. ulcerans* aumentou em diferentes países. Na Inglaterra, o número de casos de difteria pelo *C. ulcerans* superou o relacionado com o agente etiológico clássico, *C. diphtheriae* (Bonmarin *et al.*, 2009; Tejedor *et al.*, 2000; Van Dam Ap *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2010; Wang e London, 2009). Apesar de *C. ulcerans* toxigênico ser reconhecido em diversos países industrializados como um patógeno emergente, sua capacidade de causar

doença em humanos, inclusive entre habitantes de centros urbanos, ainda é frequentemente negligenciada (Dias *et al.*, 2010; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2008).

As espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, excetuando-se o *C. diphtheriae*, eram consideradas não patogênicas para o homem. A partir dos anos 80, bactérias desse grupo vêm emergindo como importantes patógenos, principalmente nos pacientes imunossuprimidos e em pacientes imunocompetentes, quando submetidos a procedimentos invasivos e cateterismo vascular. As bacteremias têm sido associadas a acessos vasculares, à endocardite tanto em pacientes portadores de próteses valvulares quanto de válvulas cardíacas naturais e em pacientes neutropênicos. Outras infecções cada vez mais relatadas na literatura científica são as meningites associadas ou não a derivações neurocirúrgicas, abscessos cerebrais, peritonites associadas à diálise peritoneal ambulatorial contínua, osteomielites, artrites sépticas, pneumonias, empiemas e infecções do trato urinário. Esses quadros clínicos estão associados à virulência de determinadas espécies de *Corynebacterium*. As modernas técnicas genéticas e fenotípicas têm permitido uma melhor caracterização taxonômica, além de estabelecer padrões de sensibilidade aos antimicrobianos por espécie e estimativas da resposta terapêutica aos antimicrobianos (Meyer *et al.*, 2005).

Corynebacterium spp. tem sido relatado com frequência crescente como patógeno de infecções nosocomiais associadas a septicemias, endocardites, infecções da ferida cirúrgica, próteses e infecções relacionadas ao cateter venoso central. Quando essas infecções estão relacionadas a espécies multirresistentes são de tratamento mais difícil e de maior toxicidade. As espécies *C. jeikeium*, *C. urealyticum* e *C. amycolatum* podem apresentar-se resistentes a diferentes agentes antimicrobianos. Além disso, amostras de *C. minutissimum*, *C. aurimucosum*, *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. pseudodiphtheriticum* e *C. macginleyi* vêm apresentando aumento nos perfis de resistência. São descritas variações geográficas na frequência de isolamento e consequentemente também na resistência natural e adquirida. No Rio de Janeiro-Brasil, em uma amostra populacional, cerca de 68% dos isolados no ambiente hospitalar corresponderam a *C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. propinquum* e *C. minutissimum*. No estudo, a urina e o acesso venoso foram os sítios mais frequentemente acometidos. No sangue e trato respiratório predominaram *C. pseudodiphtheriticum* e *C. propinquum* enquanto que *C. xerosis* e *C. amycolatum*, predominaram em cateteres venosos. Em feridas cirúrgicas foram observadas com mais frequência *C. propinquum* e *C. minutissimum* (Camello *et al.*, 2003).

Em relação ao mecanismo de resistência aos antibióticos no gênero *Corynebacterium*, estudos apontam (Adderson *et al.*, 2008; Fernandes-Roblas *et al.*, 2009) que diferentes

espécies podem mostrar resistência a antibióticos de diferentes composições químicas. Adicionalmente, estes resultados podem explicar que elementos genéticos extracromossomiais estão associados na transmissão de genes de resistência tanto em patogênicos como em potencialmente patogênicos. Usualmente, em espécies de *Corynebacterium*, os genes de resistência a antibióticos estão localizados em grandes plasmídeos, como por exemplo, resistência a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, e estreptomicina no plasmídeo pT10 descrito em *C. xerosis*. Outros elementos como as fluoroquinolonas foram descritos associados ao mecanismo de resistência, também as tetraciclinas foram observadas em estudos fenotípicos onde foi detectada em 97% das amostras. Alguns glicopeptídeos podem ser descritos como componentes da resistência aos antibióticos, como a vancomicina, um antibiótico recomendado pela maioria dos autores no tratamento empírico de infecções invasivas.

Com bases em estudos fenotípicos e genotípicos é possível entender o mecanismo da resistência aos antibióticos, próprio de cada espécie do gênero *Corynebacterium*, associado à infecções. Estes mesmos estudos podem melhorar o conhecimento sobre a sensibilidade aos antimicrobianos de diferentes espécies multirresistentes do gênero *Corynebacterium*. Atualmente alguns candidatos são indicados como os de maior eficácia no tratamento de infecções como tigeciclina, quinupristina/dalfopristina, glicopeptídeos, daptomicina e linezolida (Olender, 2012).

1.2.1 *Corynebacterium striatum*

C. striatum está amplamente disseminado no ambiente e constitui parte da microbiota normal da pele e membranas mucosas. Nos últimos anos, *C. striatum* tem sido associado com um número crescente de casos de infecções na comunidade e/ou no ambiente hospitalar (Brandenburg *et al.* 1996; Scholle, 2007; Oliva *et al.*, 2010). É potencialmente patogênico em circunstâncias específicas incluindo infecções em pacientes com doenças crônicas, hospitalizações frequentes e prolongadas, exposição a antibióticos contra bactérias Gram-negativas (que facilita a seleção de Gram-positivos), o uso de procedimentos invasivos e a presença de patologias orgânicas obstrutivas (Otsuka *et al.*, 2006; Renom *et al.*, 2007).

Um estudo apresentou o primeiro relato de múltiplos nódulos causados por *Corynebacterium striatum*. A infecção ocorreu em uma mulher imunocompetente de 72 anos

de idade e o diagnóstico foi obtido pela coloração de Gram e cultivo de biópsia pulmonar. *C. striatum* deve ser reconhecido como potencial patógeno tanto em pacientes imunodeprimidos como imunocompetentes, em circunstâncias apropriadas (Severo *et al.*, 2014).

Como várias outras espécies multirresistentes (MDR) de corinebactérias, *C. striatum* têm sido observado com maior frequência como um patógeno de infecções nosocomiais (Lee *et al.*, 2005), incluindo bacteremia (Savini *et al.*, 2013), septicemia (Martín *et al.*, 2003), infecção pulmonar (Renom *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2010), meningite (Weiss *et al.*, 1996), endocardite (Oliva *et al.*, 2010), osteomielite (Fernández-Ayala *et al.*, 2001), artrite séptica (Scholle, 2007), ceratite (Heidemann *et al.*, 1991), ferida de pele (Moore *et al.*, 2010), infecção intrauterina (Boltin *et al.*, 2009) além de sinusite e abscesso de mama (Brandenburg *et al.*, 1996; Otsuka *et al.*, 2006; Adderson *et al.* 2008; Campanile *et al.* 2009; Martins *et al.*, 2009; Boltin *et al.*, 2009). O primeiro caso de infecção do trato urinário por *C. striatum* em paciente ambulatorial, que não apresentava fatores predisponentes, foi relatado por LÓPEZ e colaboradores (2009).

C. striatum também foi recentemente descrito como agente etiológico de infecção de trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados com doença respiratória crônica e/ou imunossupressão. Na mesma oportunidade os autores descreveram as características clínicas e microbiológicas de casos de pneumonia e exacerbações das infecções respiratórias crônicas devido ao *C. striatum* (Diez-Aguilar *et al.*, 2013).

Em um relato recente na Colômbia (Beltrán-Arroyave *et al.*, 2016) apresentou-se o caso clínico de uma adolescente de 13 anos com osteomielite crônica pós-traumática na tíbia direita, com isolamento inicial de *Bacillus* spp. por métodos automatizados convencionais e a posterior confirmação de *C. striatum* pelo MALDI-TOF. Concluiu-se que o *C. striatum* é um micro-organismo emergente que deve ser considerado patogênico diante de um paciente com infecção clínica e sem isolamento de outro micro-organismo e que as opções de tratamento são limitadas devido aos altos níveis de resistência às várias classes de antimicrobianos.

Corynebacterium striatum é um microrganismo potencialmente patogênico com a habilidade de produzir surtos de infecções nosocomiais. Foi documentado um surto nosocomial causado por *C. striatum* multirresistente no Rio de Janeiro, Brasil. A identificação do *C. striatum* foi confirmada pelo sequenciamento gênico do 16S *rRNA* e gene *rpoB*. Quinze amostras de *C. striatum* foram isoladas dos pacientes e investigadas. Os achados ressaltam a importância do *C. striatum* como um patógeno nosocomial, multirresistente, emergente no mundo e o fato de que diferentes clones podem ser responsáveis por estes surtos nosocomiais (Baio *et al.*, 2013).

Na América do Sul, apenas os estudos realizados no Brasil descreveram o isolamento de *C. striatum* de materiais clínicos associado a pacientes internados que apresentavam sinais e sintomas de infecção (Camello *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2009; Superti *et al.*, 2009). No Brasil, a maioria das cepas multirresistentes de *C. striatum* são isoladas de UTIs e enfermarias cirúrgicas, principalmente aspirados traqueais de pacientes submetidos a procedimentos de intubação endotraqueal (Baio *et al.*, 2013). Investigações anteriores, revelaram que 1,9% (n=06) das amostras clínicas de origens diversas, as quais foram obtidas de pacientes com câncer e tratados em um centro de referência no Rio de Janeiro, durante um período de um ano, foram positivas para *C. striatum*: um caso de infecção do trato respiratório superior, três de infecção do trato respiratório inferior e dois casos de feridas cirúrgicas (Martins *et al.* 2009).

Um surto de infecção nosocomial por *Corynebacterium striatum* em 21 pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) foi descrito na Espanha. Foi concluído que *C. striatum* é um microrganismo emergente, multirresistente e potencialmente patogênico, capaz de causar infecções nosocomiais e colonização respiratória em pacientes com DPOC grave. Ele pode ser transmitido entre pacientes, de pessoa a pessoa e via cateteres; as infecções por *C. striatum* devem ser tratadas de acordo com os resultados do antibiograma. Uma vez que o micro-organismo é identificado, medidas universais de higiene devem ser observadas para evitar a propagação e surtos (Renom *et al.*, 2007).

Um surto consiste na recorrência de casos de uma doença em uma comunidade com determinada frequência maior do que a normal (Chin, 2000). *C. striatum* é um patógeno que tem a capacidade de produzir surtos de infecções em ambientes nosocomiais (Baio *et al.*, 2013). Amostras de *C. striatum* têm sido isoladas de pacientes e de diferentes materiais hospitalares como, cateteres, laparoscópicos, colonoscópios, nasofibrocópios, broncoscópios, materiais de urologia e de assistência respiratória (Brandenburg *et al.*, 1996; Scholle, 2007; Oliva *et al.*, 2010).

Em um hospital universitário japonês, foram obtidos 22 isolados de *Corynebacterium* spp. provenientes de hemoculturas, dos quais, 12 foram identificados como *C. striatum* por testes bioquímicos e fenotípicos. Durante um período de monitoramento por 3 anos, estas cepas podem ter contaminado os pacientes repetidamente ou podem ter contaminado prontamente o ambiente hospitalar. *C. striatum* parece ser um fator de risco potencial para infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados. Uma maior vigilância e a melhora das estratégias de controle são necessárias para diminuir as infecções por *Corynebacterium* spp. em hospitais (Qin *et al.*, 2017).

Em um relato de caso recente, realizado por DAISUKE e colaboradores (2017), uma mulher de 49 anos que havia adentrado à emergência do hospital apresentando uma dispnéia de esforço, devido a uma falha grave na função ventricular esquerda, progrediu com coagulação intravascular disseminada e distúrbios de consciência no 67º dia de admissão. Foram detectados bacilos Gram positivos em duas amostras de hemocultura no 67º dia de admissão. Foram realizados o API-Coryne teste e sequenciamento do gene 16S rRNA e foi identificado o *Corynebacterium striatum*. A bactéria também foi detectada na ponta do cateter venoso central removido e a paciente foi diagnosticada com infecção de corrente sanguínea relacionada ao uso de cateter causada por *C. striatum*.

Embora a significância e prevalência do *C. striatum* como agente causador de doença, ainda não esteja bem estabelecida, este micro-organismo tem sido responsável por uma variedade de infecções (Funke *et al.*, 1997; Otsuka *et al.*, 2006).

A maioria das infecções por *C. striatum* reportadas até hoje, foi detectada em amostras respiratórias, sendo a grande maioria das cepas multirresistentes aos antibióticos. Estudos revelaram a presença de *C. striatum* em unidades de tratamento intensivo, postulando a existência de transmissão pessoa a pessoa (Leonard *et al.*, 1994; Brandenburg *et al.*, 1996).

Corynebacterium striatum é uma bactéria multirresistente emergente. Foram identificados retrospectivamente, 179 isolados em um banco de dados clínicos. A relevância clínica, a susceptibilidade *in vitro* e a duração da terapia antimicrobiana parenteral foram obtidas a partir dos registros dos pacientes. Para pacientes com infecções associadas a dispositivos médicos, aqueles com infecções por *C. striatum* foram combinados com pacientes infectados com estafilococos coagulase-negativos para análise de controle de casos. Um total de 87 (71%) dos 121 isolados foram resistentes a todas as drogas antimicrobianas orais testadas, incluindo penicilina, tetraciclina, clindamicina, eritromicina e ciprofloxacina. Quando isolado dos dispositivos médicos, *C. striatum* foi patogênico em 38 (87%) de 44 casos. Pacientes com infecções por *C. striatum* associadas a dispositivos médicos, receberam drogas antimicrobianas parenterais por um período mais longo do que pacientes com infecções por estafilococos coagulase-negativos associadas a dispositivos médicos (média SD 69 ± 5 dias vs. 25 ± 4 dias; $p < 0.001$). *C. striatum* frequentemente apresenta resistência a drogas antimicrobianas com biodisponibilidade oral e está associado com o aumento do uso de drogas antimicrobianas parenterais (Hahn *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado em um hospital terciário da China, WANG e colaboradores (2016) analisaram amostras de *C. striatum* isoladas rotineiramente de amostras de trato respiratório inferior, dentro de um período de 14 meses. Verificaram que as amostras isoladas

eram em sua maioria multirresistentes e que os clones predominantes poderiam permanecer por longos períodos em ambientes hospitalares e poderiam ser transmitidos rapidamente entre pacientes susceptíveis. Concluíram que o *C. striatum* parece ser um importante patógeno para pacientes com fatores de risco específicos, especialmente para aqueles com baixos níveis de hemoglobina e que estejam sendo tratados com antibióticos de largo espectro.

1.2.2 *Corynebacterium amycolatum*

Os crescentes relatos vêm destacando a importância do *C. amycolatum* na etiologia de diversos processos infecciosos. Na literatura científica consultada (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) muitas das amostras isoladas a partir de processos infecciosos e pertencentes à espécie *C. amycolatum* foram anteriormente identificadas erroneamente, em diversos laboratórios, como cepas de *C. xerosis* (Barreau *et al.*, 1993; Funke *et al.*, 1996; Berner *et al.*, 1997) e *C. minutissimum* (Zinkernagel *et al.*, 1996). A partir de meados da década de 1990, a espécie vem sendo descrita como agente causal de múltiplas infecções de extrema gravidade. *C. amycolatum* apresentando resistência múltipla a antibióticos foi isolado de um caso de septicemia (De Miguel *et al.*, 1999). Esse micro-organismo também foi isolado em um caso de septicemia nosocomial de neonato prematuro (Berner *et al.*, 1997). No Brasil, uma amostra, também isolada de neonato, foi descrita em um caso de septicemia fatal no Hospital Pedro Ernesto – Rio de Janeiro (Camello *et al.*, 2003). Além disso, *C. amycolatum* já foi descrito em um caso de artrite séptica pós-implante vascular (Clarke *et al.*, 1999), após colocação de eletrodos cardíacos (Vanechoutte *et al.*, 1998) e em infecções de próteses vasculares e em fraturas expostas (Von Graevenitz *et al.*, 1998), todos esses relatos chamaram a atenção dos pesquisadores para a importância da correta identificação dessa espécie e a sua significância em diversos materiais clínicos (Esteban *et al.*, 1999). Além dos casos mencionados, mais recentemente a espécie foi isolada de peritonite em paciente submetido à diálise peritoneal (Chiu *et al.*, 2005), de endocardite acompanhada de fistulização átrio-aórtica (Daniels *et al.*, 2003), em pacientes com mastites (Pavoiur *et al.*, 2002) e de endocardites nosocomiais (Knox e Holmes, 2002). Acompanhando a prevalência em infecções de caráter comunitário e nosocomial, os crescentes relatos de múltipla resistência aos agentes antimicrobianos também vêm sendo observados (Lagrou *et al.*, 1998; Zalas *et al.*, 2004). As mutações nos genes da girase (*gyrA*) determinam resistência às

quinolonas em *C. striatum* e *C. amycolatum* (Sierra et al., 2005). *C. amycolatum* também vem sendo implicado em septicemias em pacientes leucêmicos. A análise de duas cepas através de método de identificação semi-automatizado (Api-coryne System) identificou as amostras como *C. xerosis*. Ambas foram posteriormente confirmadas como *C. amycolatum* por cromatografia em camada delgada onde foi demonstrada a ausência de ácidos micólicos (De Miguel et al., 1999).

MARTINS e colaboradores (2009) verificaram que dentre as corinebactérias isoladas de pacientes com câncer, as espécies multirresistentes *C. amycolatum* e *C. jeikeium* exibiram maior potência invasora uma vez que foram as principais responsáveis pelos quadros de bacteremias, observados principalmente, em pacientes que utilizavam cateteres venosos centrais (CVC) e apresentavam tumores sólidos, doenças linfoproliferativas e neutropenia. Além disso, observou que infecções causadas por *C. amycolatum* acometeram principalmente pacientes com tumores sólidos.

C. amycolatum é classificado como fermentativo, não lipofílico, isento de ácido micólico de *Corynebacterium* e capaz de causar sérias infecções humanas. *C. amycolatum* isolado em casos relatados de endocardite, foram suscetíveis em laboratório à vancomicina ou daptomicina e pacientes tratados com esses agentes antimicrobianos combinados com rifampicina, tiveram resultados microbiológicos e clínicos bem sucedidos. A descrição de outros casos tratados com vancomicina e daptomicina, isoladas ou em combinação, pode levar a orientações terapêuticas mais formais. Com o aumento de novos esquemas de identificação rotineiramente realizados em laboratórios clínicos, as espécies de corinebactérias não-diftéricas provavelmente estarão implicadas em um grande número de infecções. O número crescente de pacientes imunocomprometidos e o aumento do uso de dispositivos de acesso intravascular também contribuíram para esse fenômeno (Dalal et al., 2008).

Em comparação com outras bactérias Gram-positivas, as corinebactérias têm um envoltório celular incomum. Além da espessa camada de peptidoglicano, possuem grandes quantidades de lipídeos sob a forma de ácidos micólicos e lipídeos livres em suas paredes celulares. A camada de ácido micólico de certas bactérias Gram-positivas, do grupo mycolata, representa uma barreira adicional de permeabilidade, para a penetração de pequenas moléculas (solutos) solúveis em água. Consequentemente, estudos recentes demonstram que a camada de ácido micólico de bactérias individuais do grupo mycolata, contém poros, chamados porinas, para a passagem de solutos hidrofílicos. *Corynebacterium amycolatum*, uma espécie patogênica de corinebactéria, pertence à família *Corynebacteriaceae* mas não possui ácidos corinemicólicos em sua parede celular. Apesar disso, contém um canal seletivo

para cátions em sua parede celular que pode ser responsável pela limitada permeabilidade (Mohammadi *et al.*, 2013).

As corinebactérias não diftéricas são, em sua maioria, componentes da microbiota normal da pele e membranas mucosas humanas e frequentemente isoladas de amostras clínicas. Recentemente, entretanto, a classificação microbiológica deste grupo de micro-organismos e seu papel na doença clínica, tem sido mais claramente definido (Funke *et al.*, 1997). Em particular, *Corynebacterium amycolatum*, que foi descrita pela primeira vez em 1988 (Collins *et al.*, 1988), está se tornando amplamente conhecida como um patógeno importante, embora tenha sido subestimada em parte devido à sua identificação errada como *C. xerosis* (Funke *et al.*, 1996; Waiters *et al.*, 1998) um patógeno humano já bem estabelecido.

As corinebactérias não diftéricas são membros da microbiota normal da pele. Entretanto, algumas espécies como *C. amycolatum* ocasionalmente podem causar infecções. Isso sugere que a pele humana possua mecanismos adequados de controle do crescimento de corinebactérias em sua superfície. Em um estudo efetuado por Walter e colaboradores (2017), foi demonstrado que os queratinócitos são capazes de detectar a presença do *C. amycolatum* levando à indução independente do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) da proteína antimicrobiana RNase 7. A indução da RNase 7 mediada pelo *C. amycolatum* também foi confirmada em um equivalente 3D de pele humana. A relevância funcional desses achados foi demonstrada pela potente atividade antimicrobiana da RNase 7 contra *C. amycolatum* e *C. xerosis*. Além disso, a capacidade do estrato córneo humano de restringir o crescimento do *C. amycolatum* foi significativamente atenuado quando a RNase foi inativada por um anticorpo neutralizante específico. Concluiu-se que a interação da RNase 7 com o *C. amycolatum*, indica que a RNase 7 pode funcionar como uma importante molécula efetora para o controle do crescimento de corinebactérias na pele humana.

KNOX e HOLMES (2002) descreveram três casos de endocardites por três espécies diferentes de corinebactérias em um hospital em Londres, dentro de um período de 18 meses, todas associadas com dispositivos intravasculares. Estes representaram 3 de 10 casos de endocardites adquiridas no hospital identificadas neste período e inclui o primeiro caso relatado de endocardite causada por *C. amycolatum*. Este estudo enfatiza a importância das corinebactérias não diftéricas na doença humana severa. Especificamente, os clínicos e microbiologistas devem estar conscientes dos fatores potenciais de risco para endocardites por corinebactérias não diftéricas no ambiente hospitalar e o perigo de negligenciar as culturas positivas considerando-as de microbiota normal da pele ou contaminantes. Uma rigorosa

identificação dos isolados clínicos será necessária para definir o papel das corinebactérias não diftéricas na doença humana.

Corynebacterium amycolatum é um bacilo Gram-positivo saprófita da microbiota da pele. Já foi relacionado a diversas infecções em pacientes imunocomprometidos e também de diferentes tipos de próteses. TORIBIO e colaboradores (2017) relataram um caso em que o paciente apresentava descarga ocular e após a remoção do olho artificial verificou-se uma extensa área de exposição ao implante com sinais de infecção crônica. Foi coletada uma amostra para análise microbiológica através do swab do implante e a partir da cultura identificou-se o *C. amycolatum* por caracterização fenotípica. Outras espécies de micro-organismos não foram isoladas. Além de ser capaz de aderir a dispositivos cardíacos e de articulações, este caso mostrou que o *C. amycolatum* é um potencial agente infeccioso de próteses orbitárias. O isolamento de uma cultura pura de *C. amycolatum* em uma amostra ocular é extremamente raro e sugere um papel etiológico deste micro-organismo na infecção ocular ou periocular.

1.3 Fatores de risco em pacientes imunossuprimidos e infecções hospitalares

As infecções bacterianas podem ser divididas em dois grandes grupos: exógenas e endógenas. Exógenas são aquelas cujos agentes atingem o hospedeiro a partir de um reservatório ou fonte externa e endógenas aquelas causadas por agentes da microbiota normal do próprio hospedeiro; no entanto, a doença só ocorre quando a bactéria expressa seu efeito patogênico e provoca manifestações clínicas. A patogenicidade como característica básica do agente, para se expressar depende das condições do hospedeiro. Condições favoráveis para que as bactérias de baixo poder patogênico, tal qual aquelas da microbiota humana normal, se expressem, são encontradas particularmente em pacientes hospitalizados e estão associadas, na maioria das vezes, ao uso de antibióticos e imunossupressores, a atos cirúrgicos, a doenças básicas como o câncer e diabetes, ao uso de sondas e cateteres de demora. Entretanto, ocorrem também na comunidade, onde nem sempre são evidentes as razões para a bactéria expressar sua virulência (Trabulsi, 2015).

Infecções nosocomiais ou hospitalares são infecções adquiridas no ambiente hospitalar. Infelizmente tais infecções ocorrem em altas taxas em todo mundo. Muitos micro-organismos que são causas relativamente raras de infecção em indivíduos sadios podem

tornar-se causas frequentes de doenças em pacientes hospitalizados, cujos mecanismos normais de defesa imune estão enfraquecidos pela quimioterapia ou por doenças graves. Estes patógenos podem originar-se de várias fontes no ambiente hospitalar, incluindo o ar no quarto do paciente ou um profissional de saúde colonizado. Entretanto, muitos são patógenos oportunistas da própria microbiota normal do paciente (Pelczar, 2009).

O grande desenvolvimento tecnológico que ocorreu após a segunda metade do século XX disponibilizou importantes recursos diagnósticos e terapêuticos, permitindo um significativo avanço para as ciências médicas. O amplo uso de antibióticos, os procedimentos invasivos necessários para a manutenção das funções vitais do organismo e o aumento das condições imunossupressoras provocaram um elevado aumento das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Tais infecções tornaram-se um importante problema mundial, não apenas nos países desenvolvidos, onde há amplo acesso à tecnologia médica, mas também nos países em desenvolvimento (Allegranzi; Bagheri Nejad, 2011). As IRAS (infecções relacionadas à assistência à saúde) são responsáveis por aumentar a morbi-mortalidade dos pacientes, além de elevar os custos do tratamento médico.

O sistema de saúde é constantemente afetado pelas IRAS que representam um dos mais importantes problemas de Saúde Pública no mundo, e ocorrem tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Além das elevadas taxas de morbidade e mortalidade, outras consequências são o aumento do tempo de internação e dos custos decorrentes tanto para a instituição quanto para os próprios pacientes e familiares, além da ameaça constante da disseminação de bactérias multirresistentes. Ao prolongar o tempo de internação, gera-se uma elevação no consumo de medicamentos e aumento dos custos adicionais, além de retardar o retorno do paciente às suas atividades normais (CDC, 1979, Pereira, 1993, ANVISA, 2004, Oliveira *et al*, 2009, Sydnor; Perl, 2011; Ramos, 2014).

A susceptibilidade de pacientes a infecções pode ser aumentada por condições clínicas e procedimentos médicos, que permitem que os micro-organismos da microbiota sejam transferidos de seu habitat usual para alguma outra área do corpo do paciente e, desse modo tornem-se patógenos oportunistas. Os pacientes submetidos à internação são mais susceptíveis à infecção em função de fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro e fatores imunológicos. O uso intensivo de antibióticos profiláticos e terapêuticos, além do tratamento ambulatorial tem modificado a epidemiologia dessas infecções. Dentre os patógenos emergentes despontam corinebactérias, que têm sido responsáveis por infecções humanas severas em pacientes imunossuprimidos. Há relatos científicos que comprovam que as corinebactérias têm causado infecções graves como bacteremias, endocardite valvular,

infecções neurocirúrgicas, meningites, abscessos cerebrais, peritonites, osteomielites, artrite séptica, pneumonia e infecções urinárias. (Camello *et al.*, 2009)

Dentre os fatores que contribuem para a ocorrência de infecções hospitalares podemos ressaltar as transferências de genes de resistência bacteriana, o uso indiscriminado e irracional de agentes antimicrobianos, a limpeza e desinfecção inadequada das superfícies inanimadas e de materiais críticos e semicríticos. O crescimento de micro-organismos pode ser controlado através de métodos químicos e físicos. Este controle pode levar à eliminação total dos micro-organismos ou não. Dentre os métodos de eliminação parcial de micro-organismos de determinado material ou ambiente, os mais conhecidos são os de desinfecção e antissepsia. Os agentes químicos são utilizados para controlar o crescimento bacteriano tanto em tecidos vivos como em objetos inanimados. A maioria dos agentes químicos somente reduz a carga bacteriana. Nenhum desinfetante isolado será apropriado para todas as circunstâncias. Uma importante diferença entre os desinfetantes e os antissépticos está o grau de toxicidade, sendo que os desinfetantes atuam eliminando e/ou inibindo a multiplicação de micro-organismos em superfícies e materiais inanimados, enquanto os antissépticos atuam eliminando e/ou inibindo a multiplicação de micro-organismos em tecidos vivos (Vermelho *et al.*, 2007).

O aumento do número de pacientes imunocomprometidos e o uso de dispositivos invasivos tem elevado a importância clínica dos bacilos Gram-positivos em bacteremias, incluindo as causadas pelas corinebactérias. Sem a identificação correta do micro-organismo, é difícil determinar qual antibiótico administrar. A vancomicina não é universalmente ativa contra bacilos Gram-positivos e os critérios de suscetibilidade não estão padronizados (Chung *et al.*, 2008).

Diferenças epidemiológicas entre as espécies isoladas de infecções hospitalares foram encontradas na França, Turquia e Rio de Janeiro, incluindo padrões de resistência natural e adquirida. Pacientes com doenças neoplásicas avançadas, neutropenias prolongadas, desnutrição severa, procedimentos invasivos e períodos de internação prolongados, podem ser colonizados e infectados com micro-organismos de baixa virulência, muitas vezes presentes na microbiota normal (Martins *et al.*, 2009).

O isolamento de espécimes do gênero *Corynebacterium* provenientes de pacientes neutropênicos pode ser representativo tanto de um processo infeccioso oportunista, como da contaminação por um micro-organismo presente no ambiente ou ser originário da microbiota colonizante da pele e mucosas. As corinebactérias são consideradas como saprófitas ou contaminantes quando isoladas em cultura devido ao fato de serem encontradas no solo, poeira, material orgânico ou água. Muitas vezes, o isolamento de corinebactérias a partir do

sangue é considerado pseudobacteremia e, por essa razão, são muitas vezes desconsideradas como agentes etiológicos de processos infecciosos em curso. Pacientes com doenças neoplásicas avançadas, neutropenias prolongadas, desnutrição grave, procedimentos invasivos e internações prolongadas, podem ser colonizados e/ou infectados por micro-organismos considerados de baixa virulência, usualmente resistentes a esquemas antibióticos de terapia empírica. Por essa razão, a vigilância deve ser intensificada quando tais organismos, muitas vezes considerados como contaminantes ambientais, são isolados em unidades de terapia de câncer (Coyle e Lipsky, 1990; Clarridge e Spiegel, 1995; Riegel, 1998; Camello *et al.*, 2003; Meyer, 2005, Martins, 2009).

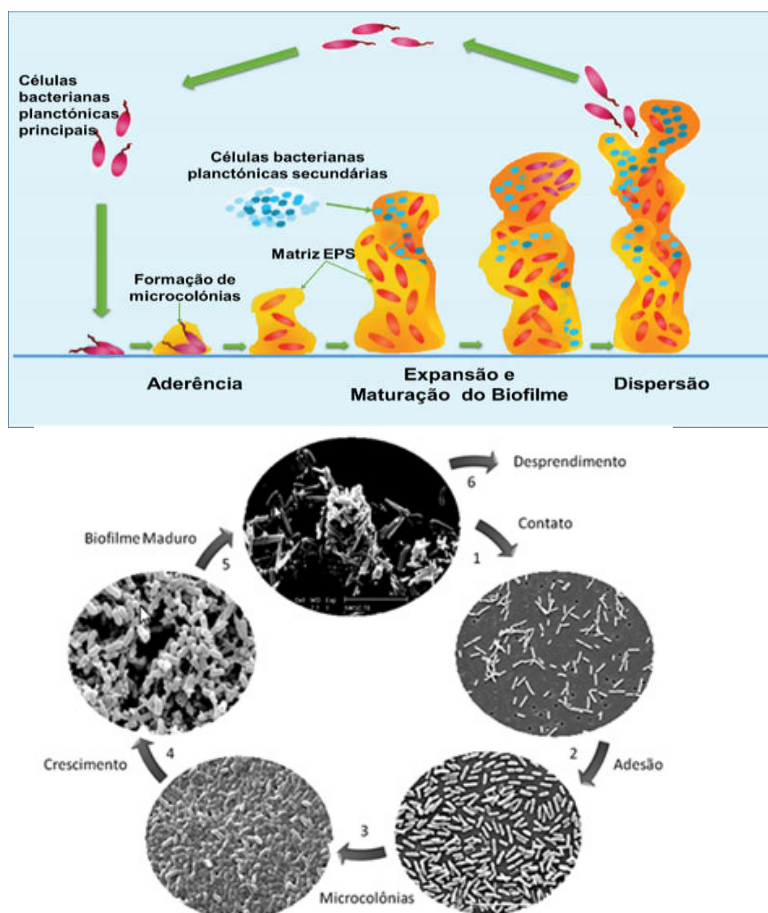
Procedimentos invasivos e cirúrgicos realizados no ambiente hospitalar podem contribuir para as IRAS. Apesar de procedimentos de esterilização e de técnicas de assepsia mais avançadas, as infecções associadas a dispositivos hospitalares representam ainda um grave problema relacionado, em parte, com o desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos (Renom *et al.*, 2007). Há relatos de infecções associadas a procedimentos invasivos diretamente relacionadas com limpeza e desinfecção primária e de alto nível inadequadas. A transmissão desses agentes infecciosos está diretamente relacionada com a maneira incorreta de reaproveitar os materiais de fins cirúrgicos, tão comuns nestes ambientes (Howie e Alfa, 2008).

1.4 Biofilme bacteriano

O biofilme pode ser definido como um conjunto de bactérias firmemente aderidas a uma superfície, englobado por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos produzidos pelas próprias bactérias. O biofilme bacteriano consiste em uma forma sésil e adaptativa no ciclo biológico das bactérias, com características genóticas e fenóticas distintas que o distingue das formas bacterianas livres e circulantes, denominadas de formas planctônicas. Estima-se que cerca de 99% das bactérias da natureza em algum momento se apresentam sob a forma de biofilme. Analogamente, os biofilmes poderiam ser comparados aos recifes de corais, às bactérias planctônicas e aos plânctons do oceano (Costerton *et al.*, 2003). Os biofilmes podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas.

O ciclo biológico para a formação de um biofilme passa pelas etapas de contato, adesão, formação de pequenas colônias, maturação e dispersão que dependem da influência do meio ambiente e das características genéticas das bactérias. A formação do biofilme é iniciada através das bactérias circulantes, que ao entrarem em contato com uma superfície, iniciam o processo de adesão formando pontes de ligação entre si e a superfície. À medida que a população em sua proximidade aumenta, as bactérias se organizam em microcolônias dispostas em monocamadas. Durante as etapas de contato, adesão e formação de pequenas colônias, cada bactéria passa a produzir moléculas sinalizadoras que, dependendo dos estímulos locais e principalmente da concentração atingida no microambiente, desencadeiam a ativação de genes específicos com a mudança do fenótipo de bactérias planctônicas para o fenótipo de biofilme (Costerton *et al.*, 1995).

Figura1: Etapas de formação do biofilme



Legenda. Desenvolvimento de um biofilme. (1) Colonização primária de um substrato; (2) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (3) coadesão de células individuais, de células coagregadas e de grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem; (4) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro, (5) dispersão ou desprendimento.

Fonte imagem acima: Animal Health Research Reviews 11(2):97-121, 2010.

Fonte Imagem abaixo: Costerton et al.,1995).

Com a adesão, colonização e formação do biofilme, cria-se um microambiente que permite a obtenção de nutrientes, proteção contra fagócitos, interferência na resposta celular do sistema imune, além de funcionar como barreira para a penetração de antibióticos. Possíveis mecanismos responsáveis pela maior resistência de micro-organismos presentes em um biofilme são: a) penetração mais lenta do antimicrobiano no interior do biofilme; b) taxa de crescimento alterada no interior do biofilme; c) outras alterações fisiológicas do crescimento celular no interior do biofilme. Uma colônia bacteriana pode também,

permanecer latente por anos, para manifestar-se em momentos de baixa imunológica (Hedrick *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2010).

Os biofilmes são comunidades sésseis, estruturadas de células bacterianas enroladas em uma matriz autoproduzida e altamente hidratada de substâncias poliméricas extracelulares (Allison, 2003). As substâncias poliméricas extracelulares são responsáveis por importantes funções do biofilme, incluindo a coesão celular, adesão às superfícies, sequestro de nutrientes e estabilidade. Bactérias que crescem em biofilmes são responsáveis por diversas infecções persistentes. A tenacidade de tais infecções é atribuída pelo menos em parte, à reduzida suscetibilidade dos micro-organismos que crescem em biofilmes para a quimioterapia antimicrobiana (Fleming, 2002; Costerton *et al.*, 1999; Donlan *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2010).

As células representam quase 15% do volume do biofilme e a matriz representa 85% (Lawrence *et al.*, 1991; Donlan *et al.*, 2002). Sua formação segue os passos sequenciais iniciados a partir da adesão ao substrato pela bactéria, seguida da proliferação e acúmulo da matriz extracelular em múltiplas camadas e culmina em uma comunidade bacteriana que se mantém sob a matriz produzida. Desta colônia, alguns micro-organismos irão se descolar e serão transportados para área vizinhas, disseminando-se sobre a superfície do biomaterial (Moraes *et al.*, 2010).

Acredita-se que a formação de biofilmes esteja associada à proteção contra possíveis agressões no ambiente. As modificações que ocorrem na forma de biofilme trazem inúmeras vantagens às bactérias. O envoltório extracelular as protege contra agressões físicas e químicas do meio externo, como a ação de raios ultravioleta e alterações do pH e de osmolaridade, além de reduzir significativamente a ação de mecanismos adaptativos e inatos do sistema imunológico, como a ação de células fagocitárias, opsonização de anticorpos. Neste processo as proteínas (opsoninas) ligam-se à superfície de bactérias ou a outros patógenos, facilitando o seu reconhecimento por receptores específicos presentes na superfície de fagócitos, favorecendo a digestão dos mesmos pelos neutrófilos, e atuando no sistema complemento (Hoyle; Costerton, 1991).

Em um estudo recente (Singh *et al.*, 2017) concluiu-se que inúmeros fatores contribuem para a resistência bacteriana nos biofilmes e tais fatores variam entre os diferentes micro-organismos. Antibióticos têm sido amplamente usados em concentrações variáveis em todo o mundo o que pode afetar a microbiota, conseqüentemente levando a alteração de genes, mutações, resistência às drogas e também influência na saúde humana. Entretanto o biofilme é mais protetor e resistente à ação dos antibióticos. O aumento da resistência aos

antibióticos do biofilme é devido: (1) difusão limitada dos agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme, (2) comunicação entre os agentes antimicrobianos com a matriz do biofilme (polímeros e células), (3) resistência mediada por enzimas, (4) níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, (5) adaptação genética, (6) bombas de efluxo e (7) estrutura da membrana externa.

Outra preocupação com o biofilme são os plasmídeos bacterianos que são componentes genéticos extracromossomiais capazes de transferir genes de resistências para outras bactérias. Estes podem ser transferidos horizontalmente por conjugação, para diferentes espécies presentes em um biofilme. Muitos pesquisadores alertam que biofilmes bacterianos favorecem a resistência a agentes químicos antimicrobianos como: desinfetantes, antibióticos e também a radiação ultravioleta (Elasri; Miller, 1999). Estudos alertam que a radiação ultravioleta não produz nenhum efeito sobre células contidas no biofilme, pois há evidências que os biofilmes apresentam uma propriedade protetora à radiação ultravioleta (Mohamed; Miller, 1999). As células bacterianas contidas em biofilmes são mais resistentes aos antibióticos comparadas com as células em seu estado planctônico (Ceri *et al.*, 2001). Diversos são os problemas causados pelos biofilmes como: biocorrosão, comprometimento de dispositivos pertinentes em ambientes hospitalares, entre outros, tudo isso é acrescido ao potencial de resistência cruzada aos agentes químicos antimicrobianos (Simões *et al.*, 2003).

1.4.1 Biofilmes e infecções associadas a cateteres intravasculares

A infecção de corrente sanguínea associada a cateter intravascular ocorre quando um micro-organismo presente no sítio de inserção, na luz ou no líquido infundido, alcança a corrente sanguínea. Isso pode resultar em bacteremia, que quando não contida, evolui para um quadro mais grave e resulta em sepse (Bonvento, 2007; Carrara, 2016).

A presença de biofilmes em cateteres intravasculares e seu papel em infecções de corrente sanguínea relacionadas ao cateter já foram bem estabelecidos. A tolerância dos micro-organismos de biofilmes associados ao cateter para tratamentos antimicrobianos sistêmicos e o potencial de desenvolvimento de resistência antimicrobiana no ambiente hospitalar, enfatiza a importância de estratégias de tratamento alternativas. Biofilmes são comunidades microbianas que exibem características únicas que devem ser consideradas na avaliação do potencial de prevenção do biofilme ou estratégias de controle. Devido às

infecções associadas ao biofilme não responderem de forma consistente a concentrações terapêuticamente viáveis de muitos agentes antimicrobianos, tratamentos mais eficazes contra as células de biofilme com crescimento lento ou tratamentos combinados que possam penetrar na matriz do biofilme, podem ser mais efetivos. Essas abordagens têm o potencial de prevenir ou erradicar biofilmes em cateteres intravasculares residentes e prevenir ou resolver infecções relacionadas aos cateteres (Donlan, 2011).

A capacidade de interagir com proteínas séricas ou teciduais presentes no momento da contaminação bacteriana parece ter importante influência na adesão, sendo que a maioria dessas interações acontece por presença de receptores específicos (Miorner *et al.*, 1980). Algumas das interações aumentam a adesão, como as que envolvem fibronectina, fibrinogênio ou trombina, ou inibem, como as que envolvem a albumina. A fibronectina está envolvida em mais adesão de *S. aureus* à superfície de substratos, pela ligação específica, tempo-dependente e irreversível (Vaudax *et al.*, 1984; Katsikogiann *et al.*, 2004). A influência da fibronectina em relação à adesão de *S. epidermidis* ainda é controversa. O fibrinogênio favorece a adesão bacteriana aos biomateriais, principalmente quando se trata dos estafilococos. A trombina, por sua vez, favorece a adesão bacteriana ao converter fibrinogênio em fibrina, que envolve o agregado plaquetário, estabilizando o trombo e favorecendo a adesão das bactérias (Hermann *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 1998). A albumina adsorvida à superfície do material tem mostrado efeito inibitório sobre a adesão nas superfícies cerâmicas, metálicas e de polímeros (Katsikogiann *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2010).

Os biofilmes são microcolônias ou agregados bacterianos envolvidos em uma película de exopolissacarídeos produzida pela bactéria, que se formam na superfície dos dispositivos plásticos quando estes são introduzidos no organismo. Os biofilmes estão fixados de maneira relativamente firme na superfície dos dispositivos, funcionando como uma fonte constante de bactérias que podem causar infecção em diferentes órgãos ou tecidos. Embora as bactérias possam aderir diretamente no plástico, a adesão é normalmente mediada por proteínas que se depositam na superfície dos dispositivos logo que são fixados em suas posições (Trabulsi e Alterthum, 2015).

Um biofilme é um consórcio microbiano associado a uma superfície e incorporado em uma matriz extracelular. A contaminação microbiana, a colonização e formação de biofilme na superfície do cateter pode ocorrer logo nas 24h após a inserção e envolve várias etapas (Donlan, 2001). Após a inserção do cateter, a superfície do dispositivo é imediatamente coberta por um filme formado por macromoléculas orgânicas tais como piruvato, glicose e fibrinogênio (Murga *et al.*, 2001). A contaminação microbiana da superfície do cateter pode

se originar da microbiota da pele, manipulação do cateter, semeadura hematogênica de outro local infectado ou menos frequentemente de uma infusão não estéril (Raad *et al.*, 1998).

A infecção de corrente sanguínea associada a cateter intravascular é uma das maiores causas de infecção nosocomial e um desafio para tratar. O grau da severidade e persistência das infecções têm piorado quando os micro-organismos formam biofilmes. Em contraste com infecções causadas por bactérias planctônicas que respondem relativamente bem às terapias antimicrobianas padronizadas, bactérias formadoras de biofilme tendem a causar infecções crônicas, pelo que as infecções persistem apesar da terapia antibiótica aparentemente adequada (Gominet *et al.*, 2017).

1.4.2 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental de infecção

C. elegans são nematódeos que constituem, atualmente, um dos mais importantes modelos *in vivo* empregados em várias áreas de pesquisas. Sua fácil manipulação genética, tendo em vista que seu genoma já foi totalmente mapeado, e a facilidade de manutenção, contribuíram para seu sucesso e amplo emprego (Leung *et al.*, 2008). Além disso, seu pequeno tamanho (~ 1 mm, quando em fase adulta), transparência, rápida reprodução, curto ciclo de vida de aproximadamente 21 dias, tratabilidade genética e facilidade de cultura usando dieta de *E. coli*, capacidade de ser congelado e a vantagem única de ser um sistema *in vivo* que possui as facilidades de manuseio encontradas em sistemas *in vitro* também são notáveis.

Embora apresente estrutura física aparentemente simples, *C. elegans* possui alta complexidade nos níveis celulares e fisiológicos. O interesse pelo modelo consiste no fato de que muitos dos processos fisiológicos básicos e respostas ao estresse observados em organismos superiores (por exemplo, os seres humanos) são também perceptíveis em *C. elegans*. Apesar de suas vantagens, como qualquer modelo *in vivo*, há algumas limitações intrínsecas em sua aplicação. Por exemplo, ele não possui algumas vias moleculares e, também, não recria a completa fisiopatologia de determinadas doenças humanas. Portanto, é crucial definir os objetivos da pesquisa e ter em mente as possíveis restrições do modelo (Kaletta e Hengartner, 2006).

Os nematódeos são capazes de distinguir a qualidade dos alimentos, mostrando preferência por bactérias com maior valor nutricional (Shtonda e Avery, 2006). Tem sido

demonstrado que *C. elegans* é capaz de diferenciar entre bactérias diferentes através de mecanismos de comportamento de proteção contra agentes patogênicos potenciais (Schulemburg e Ewbank, 2007). Enquanto a maioria das bactérias atrai *C. elegans*, algumas os repelem e causam um comportamento de repulsão. Curiosamente, *C. elegans* é capaz de aprender a evitar patógenos e usa esse mecanismo como uma alternativa para o sistema imunológico adaptativo (Balla e Troemel, 2013; Meisel e Kim, 2014).

C. elegans foi estabelecido como sistema modelo para a investigação da patogenia e fatores de virulência em *C. diphtheriae* (Ott *et al.*, 2012; Broadway *et al.*, 2013; Antunes *et al.*, 2015a, 2015b; Santos *et al.*, 2015a). Em seu habitat natural, composto de material vegetal em decomposição, este nematóide se alimenta de bactérias. Apesar de ser um predador de bactérias, ele também pode ser infectado por bactérias corineformes nematopatogênicas tais como, *Microbacterium sp.* e *Leucobacter SP* (Leung *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diversos estudos têm demonstrado que pacientes imunocomprometidos, submetidos à internação hospitalar, possuem prevalência de infecções, devido à conjugação de fatores inerentes ao hospedeiro com fatores inerentes ao ambiente hospitalar. Situações como o uso de dispositivos médicos, a realização de procedimentos invasivos e a pressão seletiva de antibióticos, podem colaborar para que espécies bacterianas colonizadoras naturais de pele e mucosas desenvolvam estratégias de resistência e adaptação, que culminem com o aumento da virulência de suas infecções.

O presente estudo teve como objetivo geral a caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em um hospital terciário. Em cumprimento a esta meta os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Identificar as espécies de bastonetes Gram-positivos irregulares, obtidos de processos de infecção e/ou colonização em pacientes hospitalizados, por meio de métodos fenotípicos, genotípicos e espectrometria de massa (MALDI-TOF);
2. Avaliar a prevalência de *Corynebacterium* spp. oriundos de hemoculturas de pacientes hospitalizados;
3. Avaliar os perfis de resistência aos agentes antimicrobianos das espécies de corinebactérias prevalentes;
4. Analisar o perfil clonal das espécies bacterianas predominantes pela técnica de PFGE;
5. Avaliar a interação das amostras bacterianas com superfícies abióticas diversas;
6. Verificar a natureza glicídica do biofilme formado pelas amostras estudadas (produção de *slime*) utilizando meio Vermelho do Congo;
7. Analisar a composição do biofilme formado pelas amostras estudadas sobre superfícies abióticas diversas através de colorações específicas;
8. Avaliar a ultraestrutura de biofilme através de microscopia eletrônica de varredura;
9. Analisar a aderência, viabilidade intracelular e persistência de isolados clínicos de *Corynebacterium* spp. em células humanas respiratórias (pneumócitos A549);
10. Analisar quantitativamente a produção de biofilme pelas amostras estudadas em superfícies de vidro e poliestireno;

11. Analisar semi-quantitativamente a produção de biofilme pelas amostras estudadas em superfícies de poliestireno com e sem adição de dipyrityl.
12. Avaliar a interação bacteriana *in vivo* utilizando o modelo experimental nematódeo *Caenorhabditis elegans*;
13. Verificar a ocorrência de alterações hematológicas significativas em camundongos experimentalmente infectados, por via endovenosa, com as amostras estudadas;
14. Relacionar as espécies de corinebactérias e suas características microbiológicas com a topografia, relevância clínica, características da população estudada e os fatores de risco associados com a hospitalização, doença de base, procedimentos invasivos e exposição à patógenos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de dados

O estudo foi realizado no Hospital Central do Exército (HCE) na cidade do Rio de Janeiro, onde foram avaliadas 548 hemoculturas de pacientes que se encontravam internados, enviadas ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC/HCE) para diagnóstico microbiológico.

O estudo abrangeu a coorte de pacientes hospitalizados, no período de fevereiro a dezembro de 2015, mantidos em diversos setores de internação (CTI geral, CTI coronariano, Clínica Médica, Emergência) do Hospital Central do Exército (HCE). Neste trabalho, para definição de infecção da corrente sanguínea, utilizamos o critério anteriormente descrito por GARNER e colaboradores (1988) e adotado pelo CDC.

Foram excluídas das análises as repetições de resultados oriundos de coletas com intervalos de tempo inferiores a 48 horas.

3.2 Considerações Éticas

A despeito de não haver interação direta entre a autora e os pacientes, esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob o nº CAAE 40828814.0.0000.5259, versao1/HUPE/UERJ (**Anexo I**), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Exército Brasileiro, Gabinete da Diretoria de Saúde do Exército, Brasília – DF, sob o Diex nº 226/2014- Sec_Cpc/AEPG/Gabdir – EB: 64446.061592/2014-93 (**Anexo II**) e, também, pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais CEUA /029/2015 (**Anexo III**).

Os familiares e/ou pacientes internados no Hospital Central do Exército foram convidados a participar da pesquisa e em caso de concordância, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE – (**Anexo IV**).

3.3 Origem, isolamento e estocagem dos micro-organismos

As amostras de sangue para hemocultura foram coletadas pela equipe multiprofissional que trabalha nas diversas unidades do HCE como parte da rotina de assistência aos pacientes. A coleta foi realizada com técnica asséptica e, cada amostra foi armazenada em frasco estéril para hemocultura. Após a coleta, o material foi enviado ao Laboratório de Análises Clínicas do HCE.

As hemoculturas identificadas como positivas através do sistema automatizado BacT/ALERT (BioMérieux, France), excluídas as repetições, foram selecionadas para a pesquisa de bacilos Gram-positivos (BGP)

Para o isolamento foram utilizados os meios: (1) Agar Sangue de Carneiro a 5%; (2) Agar Chocolate com Telurito (ACT-Base de Agar Sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro tratado a 80°C por 5 minutos, sob agitação, acrescido de telurito de potássio (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) a 0,07% (concentração final).

Alíquotas obtidas das hemoculturas foram semeadas por esgotamento em placas de ágar sangue (Columbia Agar Base - KASVI - acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro) e incubadas a 37°C por 24h a 48h, como procedimento de rotina do HCE, sendo que, para o presente estudo, foram repicadas também para placas de ágar chocolate com telurito e incubadas a 37°C por até sete dias. As colônias obtidas foram submetidas a análises morfo-tintoriais e bioquímicas pelos métodos bioquímicos convencionais, sistema semi-automatizado API Coryne e por espectrometria de massa (MALDI-TOF - Bruker) para identificação das espécies isoladas (Van *et al.*, 2014).

Adicionalmente foram utilizadas como controles, em diferentes etapas dos experimentos, as cepas *C. diphtheriae* padrão CDC-E8392, clínica BR-CAT5003748, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 e a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Todas as amostras foram estocadas sob congelamento a -20° C em TSB (*Tryptic Soy Broth* -Oxoid™) contendo 20% de glicerol e a temperatura ambiente em meio CTA (*Cystine Tryptone Agar* – Difco Laboratories, Detroit, USA) na Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica – LDCIC – Disciplina de Microbiologia e Imunologia – FCM/UERJ.

3.4 Identificação através de provas bioquímicas convencionais

As amostras previamente identificadas através do MALDI-TOF foram confirmadas pelos teste bioquímicos convencionais, incluindo ensaios de hidrólise da esculina e uréia, redução de nitrato, metabolização dos carboidratos em meio de CTA contendo 1% da solução dos seguintes açúcares: glicose, maltose, sacarose, ribose, frutose, xilose, manose, arabinose, trealose, galactose e manitol; atividades de DNase, gelatinase e pesquisa de fator CAMP (Janda, 1998a; Camello, 2008; Koneman, 2010; Funke; Bernard, 2011).

Para as estirpes bacterianas pertencentes ao Complexo XSMA (formado pelas espécies *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. amycolatum*) foram realizados os seguintes testes adicionais: suscetibilidade ao agente vibriostático O/129 (150 cg/disco - 2,4-diamino-6,7-disopropylpeptidina) (Oxoid), hidrólise da tirosina (Wayters *et al*, 1998, Almuzara *et al*, 2006, Funke; Bernard, 2011).

3.5 Identificação através do sistema semi-automatizado API Coryne

As amostras bacterianas com morfologia compatível com o gênero *Corynebacterium* foram submetidas a identificação pelo sistema API Coryne (REF 20900, bioMerieux, France).

Para a preparação da galeria foi adicionada água destilada nos alvéolos da caixa de incubação para criar uma atmosfera úmida. A galeria foi retirada da embalagem e colocada na caixa de incubação identificada. O inóculo foi preparado a partir de cultura pura de cada amostra, previamente, semeada em ágar sangue, com crescimento de 24-48 horas a 37°C. Foi preparada uma suspensão bacteriana equivalente ou superior a escala 6 de McFarland na ampola API Suspension Medium. Posteriormente esta suspensão foi distribuída nos substratos NIT (nitrato) a GEL (gelatina). Cerca de 0,5 mL desta suspensão foi inoculada na ampola API GP Medium contendo meio enriquecido (composição: L-Cistina, Triptona bovina, cloreto de sódio, sulfito de sódio, vermelho de fenol, água desmineralizada e pH 7.4-7.8) e homogeneizada bem, na qual foi distribuída nos substratos O (oxidativo) a GLYG (glicogênio). Nos substratos URE (urease), O a GLYG foi adicionado óleo mineral estéril para criar uma condição de anaerobiose. A caixa de incubação foi fechada e mantida a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação foi adicionada uma gota dos seguintes reagentes abaixo nos respectivos substratos e a leitura realizada após 10 minutos:

- Substratos NIT (Redução de nitrato a nitrito): Reagentes NIT1 e NIT2
- Substrato PYZ (pyrazinamidase): Reagente PYZ
- Substratos PyrA (pyrrolidonil arilamidase); PAL (fosfatase alcalina); β GUR (beta-glucuronidase); β GAL (beta-galactosidase); α GLU (alfa-glucosidase); β NAG (N-acetil- β -glucosaminidase): Reagentes ZYM A e ZYM B.

Após a leitura das provas enzimáticas a galeria de testes foi incubada por mais 24h e foi realizada a leitura definitiva das demais provas bioquímicas.

A prova da catalase foi realizada utilizando uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% sobre a colônia crescida no meio TSA e disposta sobre lâmina de vidro.

O resultado positivo ou negativo atribuído a cada substrato na ficha de resultado, foi observado através da mudança de coloração do substrato. Para cada teste foi atribuído um valor numérico de acordo com o resultado positivo ou negativo. A identificação das espécies foi obtida segundo as instruções do fabricante, a partir da comparação do perfil numérico obtido para cada amostra junto ao banco de dados acessado online pelo site do sistema apiweb (<https://apiweb.biomerieux.com>).

3.6 Identificação através da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF

A técnica de MALDI-TOF (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*) consiste na análise proteômica microbiana através da ionização das proteínas e detectadas em espectrômetro de massa. O espectro é analisado e o padrão comparado àqueles depositados na base de dados, originando um grau de concordância com a espécie bacteriana anteriormente depositada (Konrad et al., 2010; Alatoom et al., 2012; Bernard et al., 2012).

No presente estudo, para a identificação proteômica das amostras foi utilizado o aparelho MALDI-TOF (Bruker) do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central do Exército. Foram considerados fidedignos os scores a partir de 1.7 de acordo com BARBERIS e colaboradores (2014).

3.7 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através do método de disco-difusão em ágar. A partir de uma cultura pura de cada amostra, foi preparada uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland em salina a 0,85%. A suspensão bacteriana foi semeada, para formação de uma camada confluenta, com auxílio de um swab estéril na superfície do meio ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubado a 37°C por 24 horas. Para as amostras com crescimento lento, a leitura final foi realizada após 48 horas de incubação. Os resultados foram analisados através da halometria e expressos como sensível (S) resistente (R) e intermediário (I), conforme os valores previamente determinados (Martinez-Martinez *et al.*, 1995; Funke *et al.*, 1997; CLSI M45, 2015).

Os seguintes antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, UK) foram testados: penicilina (10U), ampicilina (30µg), cefotaxima (30µg), cefepime (30µg), ceftriaxona (30µg), imipenem (10µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), linezolida (30µg), ciprofloxacino (5µg), tetraciclina (30µg), gentamicina (10µg), rifampicina (5µg), vancomicina (30µg), nitrofurantoína (300µg), amoxilina/Ac.clavulânico (30µg), sulfametoxazol/trimetropim (25 µg), meticilina (10µg), azitromicina (15µg), daptomicina (2µg), ampicilina/sulbactam (10 µg), tobramicina (10µg), fosfomicina (200 µg) e mupirocina (200 µg).

3.8 Caracterização Genotípica por PFGE

Todas as amostras identificadas como *C. striatum* foram submetidas à análise da clonalidade através da técnica de PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*) conforme anteriormente descrito por BAIO e colaboradores (2013).

Inicialmente, foi efetuada a extração do DNA genômico. As amostras foram semeadas TSA e incubadas a 37°C por 24h, então, foram recolhidas 3 a 4 colônias para semeadura em BHI (3 ml) e nova incubação a 37°C por 2h ou até a suspensão atingir a escala 2 de McFarland. A seguir 2ml do cultivo foram transferidos para eppendorfs estéreis e centrifugados a 8.000rpm por 10min, para obtenção do *pellet*. O excesso do meio foi retirado com o auxílio de ponteira estéril e o pellet foi ressuspenso com 200 µl de tampão PIV,

homogeneizado com cuidado e em seguida adicionou-se 200 µl de agarose a 2% a 50°C (NuSieve GTG Lonza, low melting). A mistura foi transferida para os blocos de modelagem e refrigerada (2-8°C por 30min.) para geleificação da agarose. Os blocos formados (com 2mm de altura) foram transferidos para tubos identificados contendo 2ml de solução de lise/amostra contendo 10U/ml de lisostafina (Sigma-Aldrich), 10U/ml de mutanolisina (Sigma-Aldrich) e 1mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich) onde permaneceram sob incubação a 37°C por 24h. Após essa incubação a solução de lise foi removida com auxílio de uma pipeta estéril e foram adicionados 2 ml do tampão de proteinase K para nova incubação a 50°C *overnight*. Posteriormente efetuou-se a lavagem dos blocos de agarose da seguinte forma por imersão em tampão TE (USB, pH 7,5 – 4ml por tubo). O tampão foi trocado de hora em hora com auxílio de uma pipeta por 2 dias consecutivos.

Após as lavagens, os blocos foram transferidos para um tubo contendo 200 µl de solução da enzima de restrição Swa I em água ultrapura de acordo com as instruções do fabricante. A temperatura e o tempo de incubação também seguiram o protocolo do fabricante. Para a realização da eletroforese em gel de agarose foram preparados 2,5 L de tampão TBE 0,5X (BioRad) deixando de reserva 100 ml para preparar o gel de agarose a 1,2%. Na cuba de corrida 2,4 litros do tampão TBE 0,5X foram colocados e a temperatura do aparelho ajustada para 13°C no CHEF DRII system (Bio-Rad). Enquanto isso, a solução com a enzima de restrição, foi cuidadosamente retirada para não danificar os blocos e os mesmos foram colocados em microtubos para serem dissolvidos a 68°C ou 69°C em termobloco previamente aquecido.

O PFGE foi realizado em géis de agarose 1,2% com pulsos de 1-30 segundos por 22 horas e sob tensão de 6V/cm e angulação de 120°. Aliquotas de 50 µl foram aplicadas no gel para a corrida. Após a corrida o gel foi transferido para um recipiente pequeno, coberto com de água destilada e adicionado de 80 µl de solução de brometo de etídio (Promega, 10 mg/ml).

Finalmente, o gel foi corado por 30 minutos e descorado por 30 minutos e submetido a radiação UV para revelação das bandas formadas e captura de imagem.

Os perfis de PFGE foram analisados utilizando comparação visual entre as amostras e com auxílio de análise automatizada pelo programa Bionumerics versão 6.0. Os coeficientes de similaridade de Dice foram calculados com uma tolerância de posicionamento de banda de 1,5%. Os isolados foram agrupados em pulsotipos considerando-se a similaridade de bandas mínima de 80% de acordo com o critério descrito por TENOVER e colaboradores (1995).

3.9 Caracterização da Virulência

As amostras clínicas *C. striatum* HCE-BR58 e amostras clínicas *C. amycolatum* HCE-BR326, HCE-BR395 e HCE-BR528 foram selecionadas para a investigação de aspectos da virulência através dos ensaios de produção e caracterização de biofilme em superfícies abióticas, interação com células humanas, ensaios de infecção experimental em modelos nematódeos e animais.

3.9.1 Avaliação das propriedades adesivas e da formação de biofilme

3.9.1.1 Preparo das suspensões bacterianas

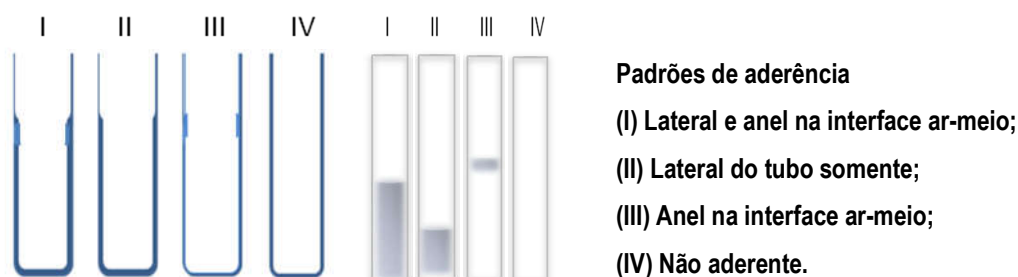
As amostras de *C. striatum* e *C. amycolatum* foram previamente cultivadas em estufa a 37°C por 48 horas em placas de TSA (Trypticase Soy Agar, Oxoid™). Suspensões bacterianas foram preparadas em TSB (Trypticase Soy Broth, Oxoid™) na turbidez equivalente a densidade óptica de 0,2 a 550nm (~10⁸ UFC/ml).

3.9.1.2 Análise qualitativa da produção de biofilme em vidro

Tubos de ensaio (15x100 mm) contendo 6 mL de TSB foram inoculados com amostras de *C. striatum* e *C. amycolatum* (~10⁸ UFC/ml) e incubados por 48 horas a 37°C. Após esse período, cada cultura foi levemente homogeneizada por 5 segundos para remover células bacterianas não aderentes a superfície do vidro e o meio de cultivo foi dispensado. Novo meio de cultura foi adicionado aos tubos que foram reincubados por mais 48 horas, esse processo foi repetido duas vezes. Após o terceiro descarte do meio de cultura, os tubos foram gentilmente lavados com PBS pH 7,2, colocados para secar a 37°C por 16h (“overnight”), corados por 5 minutos com solução de cristal violeta a 2%. Os padrões de aderência revelados foram classificados de acordo com os seguintes critérios: I – bactérias aderidas nas laterais do

tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; e IV – ausência de bactérias aderidas (Mattos-Guaraldi; Formiga, 1991).

Figura 2: Padrões de aderência na formação de biofilme em tubos de vidro



Legenda. Padrões de aderência na formação de biofilme em tubos de vidro.
Fonte: A Autora, 2018

3.9.1.3 Análise quantitativa da produção de biofilme em vidro

Lamínulas de vidro (13mm), foram dispostas com o auxílio de uma pinça em uma placa de 24 poços e posteriormente cobertas com 500µl da suspensão bacteriana das amostras em estudo. Após a incubação por 48 horas a 37°C, retirou-se a suspensão bacteriana e os poços foram preenchidos com TSB e a placa retornou para a estufa por mais 48h. Esta troca de meio de repetiu por mais uma vez e após as últimas 48h de incubação, as lamínulas foram lavadas em PBS e o biofilme formado sobre a superfície foi quantificado, após extração por abrasão utilizando areia estéril (Vórtex multifuncional K40-1010, velocidade máxima por 1 minuto), através de contagem de células sésseis viáveis em TSA (UFC/ml) conforme previamente descrito (Brun-Bruissson et al., 1987; Dooley et al., 1996).

3.9.2 Determinação do padrão de aderência à superfície de poliestireno

3.9.2.1 Análise semiquantitativa da formação de biofilme em superfície de poliestireno (com e sem adição de Dipyrídy)l)

A produção de biofilme foi avaliada semiquantitativamente através de uma modificação do método descrito previamente por Stepanovic (2000). Duzentos microlitros das suspensões bacterianas (10^8 bactérias/ml) com densidade óptica (DO) 0,2 a 550nm, colocados em placas de 96 poços de fundo reto (Nunc®) e incubados por 48h a 37°C. As amostras utilizadas foram: HCEBR-58 (*C. striatum*), HCEBR-326, HCEBR-395 e HCEBR-528 (*C. amycolatum*), como controle positivo foi utilizada a amostra *C. diphtheriae* BR-CAT5003, e como controle negativo, foi utilizado tubo contendo TSB (*Tryptic Soy Broth*) estéril.

Ao término da incubação, os poços foram lavados 2 vezes com PBS (0,01M; pH 7,2). Duzentos microlitros (200 µl) de cristal violeta a 2% foram adicionados em cada poço e, após 5 minutos, a placa foi lavada exaustivamente com água destilada e submetida à secagem à temperatura ambiente. Posteriormente, cento e sessenta microlitros (160µl) de ácido acético glacial a 33% foram adicionados aos poços, para eluição do corante.

Para a avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno com dipyrídy)l, o procedimento foi idêntico ao descrito anteriormente, exceto pela adição de 5,0 µl de uma solução do quelante de ferro, 2,2 dipyrídy)l a 400mM em 3,0 ml de TSB, às suspensões bacterianas, propiciando um cultivo em condições de privação de ferro, conforme descrito anteriormente por MOREIRA e colaboradores (2003).

A absorbância (DO) de cada poço foi aferida utilizando-se espectrofotômetro apropriado (leitor de ELISA; Bio-Rad, modelo 550), em comprimento de onda de 570nm. As amostras foram classificadas em quatro categorias com base na DO: não-aderentes (0: $DO < DO_C$), fracamente (+: $DO_C < DO \leq 2 \times DO_C$), moderadamente (+ +: $2 \times DO_C < DO \leq 4 \times DO_C$), ou fortemente (+ + +: $4 \times DO_C \leq DO$) aderente, com base na densidade óptica das suspensões bacterianas (Stepanovic et al., 2000 e Gomes et al., 2009).

3.9.2.2 Análise quantitativa da produção de biofilme em poliestireno

Lamínulas de Thermanox® (Nunc) de 13mm foram depositadas em placas de cultivo celular de 24 poços, sendo imersas em 500 µl das suspensões bacterianas em estudo, foram processadas conforme descrito no item 3.9.1.3, porém, com uma única troca do meio TSB após 48h de incubação. Posteriormente, foi realizada análise quantitativa através de extração das células sésseis por abrasão utilizando areia através da contagem de viáveis em placas contendo meio *Trypticase Soy Agar* (Brun-Bruissson *et al.*, 1987; Dooley *et al.*, 1996).

3.9.2.3 Análise ultraestrutural do biofilme formado através de Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise ultraestrutural de biofilme formado na superfície de substratos abióticos (poliestireno) os ensaios de MEV foram realizados conforme descrito anteriormente (Gomes *et al.*, 2009, Souza *et al.*, 2015). Lamínulas de Thermanox™ (Nunc) estéreis foram adicionados aos poços de placas de cultura de células de 24 poços estéreis (TPP, EUA). Em seguida, 1 mL de suspensão bacteriana preparada em meio TSB (Himedia, Índia) na concentração correspondente a D.O. 0.2 a $\lambda = 550\text{nm}$ foi adicionada aos poços contendo lamínulas e a microplacas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 1 ml de solução salina estéril. Posteriormente, as lamínulas infectadas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em soluções de crescentes concentrações de etanol, submetidas ao ponto crítico com dióxido de carbono e metalizadas com nanopartículas de ouro. A análise da ultraestrutura do biofilme bacteriano formado na superfície das lamínulas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310, do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO).

3.9.2.4 Análise da composição do biofilme formado sobre superfícies abióticas diversas através de colorações específicas

O biofilme foi formado sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços, em caldo TSB (Trypticase Soy Broth - Difco) por 48h/37°C, com troca de meio após um período de 24h. Passadas 48h, o meio foi removido e a lamínula foi lavada duas vezes com 500 µl (microlitros) de PBS, após a lavagem o biofilme foi fixado com 500 µl (microlitros) de metanol por 5 minutos. Após a fixação foi corado Coomassie Blue 0,02% por 15 minutos e safranina 0,1% por 5 minutos. Terminada a coloração a lamínula foi novamente lavada com PBS e montada na lâmina para coloração de gram com Entellan™ (Merck) por 48h. As lamínulas foram observadas pelo microscópio Axioplan 2 (Zeiss Oberkochen, Ge).

3.9.2.5 Verificação da natureza glicídica do biofilme formado (produção de *slime*) utilizando meio Vermelho do Congo

O ensaio realizado pelo método do meio Ágar Vermelho do Congo (AVC), proposto por Freeman, Falkiner e Keane (1989), possibilitando a detecção de componentes de superfície bacteriana de natureza polissacarídica, com base nas características apresentadas pelas colônias. As amostras foram semeadas como spots de 10 µL de suspensão bacteriana preparada em tampão PBS pH 7,2 com turbidez equivalente a 0,5 na escala nefelométrica de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL) a partir de culturas crescidas por 24 horas a 37°C e mantidas após esse período em temperatura ambiente por 24h.

Os resultados foram interpretados com base nas características coloniais de crescimento no meio de cultura. As amostras cujos *spots* apresentaram coloração negra e aspecto seco foram consideradas como reação positiva no teste, enquanto as amostras que apresentaram coloração vermelha e aspecto liso foram caracterizadas como negativas. Crescimentos com coloração vermelha que apresentem progressivo escurecimento, contudo sem apresentar consistência seca são considerados como resultado indeterminado (Freman, Falkiner; Keane 1989). Para essa última reação é utilizada a denominação *bordeaux*, introduzida na literatura por ARCIOLA e colaboradores (2002).

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram analisados e tratados estatisticamente (análises paramétricas e não paramétricas) através de programa estatístico Prisma (GraphpadPrism versão 4.0) e foram consideradas diferenças significativas quando $P < 0.05$. Cada ensaio foi realizado em triplicata em, pelo menos, três experimentos independentes. Foram utilizados testes Tukey (ANOVA) e T de Student não pareado de acordo com os ensaios analisados.

3.11 Ensaio de interação celular

3.11.1 Cultivo e preparo do inóculo bacteriano

Para a realização dos ensaios de aderência em cultura de células, optou-se pela utilização de células de linhagem A549 (pneumócitos humanos), visto que *C. striatum* e *C. amycolatum*, foram previamente referidos como potenciais agentes etiológicos de pneumonias nosocomiais. Cultivos estacionários foram lavados e ressuspensos em meio de cultura DMEM/F12 (Eagle's Minimal Essential medium; Sigma chemicalco., St Louis, MO, USA) modificado por Dulbecco suplementado com F12; o inóculo bacteriano foi ajustado para uma contagem de 10^7 UFC/ml, equivalente à D.O. 0,1 de absorbância ($\lambda = 570\text{nm}$) aferida em espectrofotômetro B295 II (Micronal). Durante os experimentos, as monocamadas foram infectadas com 10^6 UFC/ml (MOI de 100). As contagens de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) das suspensões bacterianas utilizadas como inóculo, sobrenadantes de cultivos infectados e lisados diversos, foram realizados por diluição seriada e cultivo em placas para contagem de colônias. Nosso estudo foi realizado, inicialmente nos tempos de infecção de 3h, 6h (Hirata Jr *et al.*, 2004).

3.11.2 Cultivo das células eucarióticas

3.11.2.1 Cultivo e manutenção de pneumócitos humanos (A549)

Células A549 (pneumócitos humanos) foram mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido e após o descongelamento foram cultivadas em estufa de CO₂, 95% de umidade relativa, a 33°C, em garrafas de 75 cm² em meio DMEM/F12, acrescido de 10% de SFB, suplementado com L-glutamina 2,5mM, gentamicina 50 µg/mL e fungizona 2,5 µg/mL. As células foram tripsinizadas e destacadas com meio de cultura completo. Quantidades equivalentes a 5,0 x 10⁶ células/ml foram utilizadas para a obtenção de tapete confluyente para os ensaios de aderência e invasão celular em placas de cultura de células de 96 orifícios (Corning, USA).

3.11.2.2 Ensaios de interação com pneumócitos humanos (A549)

As células bacterianas foram lavadas três vezes com PBS (0,01M; pH 7,2) e ressuspensas em DMEM até alcançar a D.O. 0.2 ($\lambda = 570\text{nm}$). As monocamadas celulares preparadas em placas de poliestireno de 96 poços foram infectadas com 100µl das suspensões bacterianas e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂.

Após os períodos de infecção, alíquotas do meio de cultivo celular foram reservadas para a contagem de bactérias viáveis livres no sobrenadante e os tapetes celulares foram lavados 3 vezes com PBS para eliminação das bactérias não associadas e de resíduos do meio de cultivo celular. Os tapetes celulares foram, então, tratados com PBS contendo 0,1% de Triton X100 por 30 segundos, para que as células fossem lisadas. As alíquotas reservadas dos sobrenadantes e os lisados celulares foram diluídos e plaqueados em TSA (*Trypticase Soy Agar* - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA), permitindo a contagem de bactérias viáveis associadas ao tapete.

Parte dos poços foi reservada para o ensaio de exclusão com antimicrobiano, sendo expostos a 100µL de solução de vancomicina (5 µg/ml) durante 1 hora, com a finalidade de eliminar bactérias extracelulares aderidas às monocamadas 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 foram calculados a partir das relações entre os números de bactérias associadas com as contagens de bactérias viáveis no sobrenadante somado ao número de células viáveis associadas às monocamadas. Já os percentuais de internalização foram calculados a partir da relação entre o número de bactérias viáveis intracelulares e o número de bactérias associadas (Hirata Jr, 2004; Santos *et al.*, 2010).

De forma similar ao ensaio de exclusão, alguns poços foram reservados para a avaliação da persistência, sendo, após a incubação de 3h e 6h, lavados e reincubados com 100 µl de meio contendo vancomicina (5µg/mL) por 24 horas para a eliminação de bactérias extracelulares. Em seguida, as monocamadas celulares foram novamente lavadas e lisadas. O lisado obtido foi diluído e plaqueado em TSA. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C e as colônias foram contadas, obtendo-se o número de UFC/ml no lisado.

3.12 Ensaios com modelos *in vivo*

3.12.1 *Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção *in vivo*

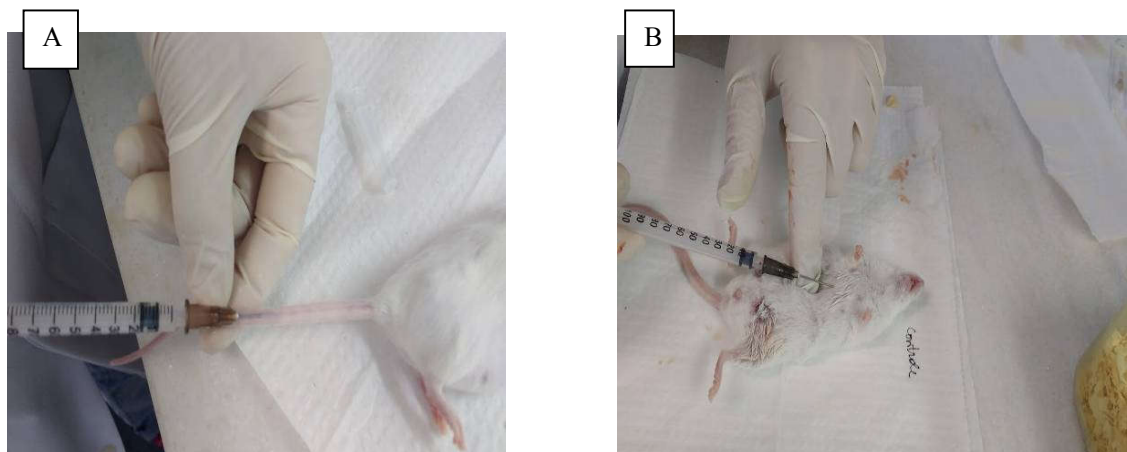
Os ensaios foram realizados conforme descrito previamente sendo analisados pelo método de sobrevivência de Kaplan-Meier (Bono e Bargmann, 1998; Browning *et al.*, 2013; Antunes *et al.*, 2015a, 2015b; Santos *et al.*, 2015a). Resumidamente, *C. elegans* N2, foram mantidos em placas contendo meio de crescimento de nematódeos (NGM) durante cerca de sete dias a 20 °C. Vinte vermes na fase larval L4 foram selecionados e transferidos para placas semeadas com 20 µl das suspensões bacterianas (D.O. 0,1 = 570nm). Os vermes foram avaliados diariamente após a infecção e os indivíduos mortos foram contados e removidos a cada 24 h por 5 dias. Para cada cepa, 60 nematóides (ensaios em triplicata) foram utilizados. A cepa *E. coli* OP50 foi utilizado como controle negativo.

3.12.2 Inoculação de amostras bacterianas em camundongos

As amostras *C. striatum* HCE-BR58 e *C. amycolatum* HCE-BR326, HCE-BR395 e HCE-BR528 foram submetidas à investigação de mecanismos de infecção e disseminação via hematogênica, utilizando-se, como modelo experimental *in vivo*, treze camundongos Swiss-Webster, de 12 semanas de idade, sexo feminino, mantidos separados em caixas de acordo com as amostras estudadas, e aclimatizados durante uma semana antes da realização do experimento. Todos os procedimentos com camundongos ocorreram no biotério da UERJ.

As amostras foram cultivadas em TSB (*Tryptic Soy Broth*) e o inóculo bacteriano contendo 1×10^9 UFC por amostra teve como veículo solução salina estéril. Os animais foram infectados através da veia caudal com 0,1 ml do inóculo (**Figura 3**); três animais foram reservados como controles-negativos e inoculados somente com solução salina estéril. 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 intraperitonal com quetamina (75-150mg/kg) e xilazina (10mg/kg), o sangue 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. Ao fim do experimento os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia em estrito acordo com leis brasileiras de ética em experimentação animal (CONCEA, 2013). A análise dos valores hematológicos encontrados foi realizada tendo por referência o trabalho de SANTOS e colaboradores (2016).

Figura 3: Ensaios com camundongos Swiss Webster



Legenda – A: Inoculação da suspensão bacteriana na veia caudal; B: Punção cardíaca para obtenção de amostra para hemograma.

Fonte: A Autora, 2018.

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos clínico-epidemiológicos das infecções por BGP

Neste trabalho foram investigadas 548 hemoculturas, coletadas de fevereiro a dezembro de 2015, de onde foram identificadas 19 hemoculturas positivas para Bacilos Gram-positivos, oriundas de 15 pacientes internados em um Hospital Terciário da Região Metropolitana do Rio de Janeiro (Hospital Central do Exército). As principais características clínicas dos pacientes de onde foram isoladas as cepas de bacilos Gram-positivos estão descritas no **Quadro 1**.

Quanto ao tempo de internação, observamos que os pacientes infectados por *C. striatum* apresentaram os tempos de internação mais extensos (aproximadamente 7 semanas), além disso, observando a coorte estudada nota-se que o grupo de pacientes hemoculturas positivas para corinebactérias apresentou média de tempo de internação (aproximadamente 5,5 semanas) significativamente mais elevado em comparação aos demais (aproximadamente 1,5 semanas). Dos cinco pacientes de onde foram isoladas amostras de *C. striatum* (excluídas as repetições) quatro evoluíram ao óbito, um percentual de 80% de óbito. Com relação a *C. amycolatum*, dos três pacientes, um evoluiu a óbito durante o período de estudo.

4.2 Caracterização fenotípica

4.2.1 Testes Bioquímicos Convencionais, Sistema APICoryne e MALDI-TOF

Através da espectrometria de massa foram identificadas as seguintes espécies *C. striatum* (n=07), *C. amycolatum* (n=03), *C. aurimucosum* (n=01), *C. minutissimum* (n=01), *Brevibacterium ravenburgense* (n=01), *Dietzia maris* (n=01), *Listeria monocytogenes* (n=02), *Tsukamurella paurometabola* (n=01). Adicionalmente duas amostras não foram identificadas pelos métodos bioquímicos convencionais, nem pelo MALDI-TOF sendo indicadas como prováveis espécies *C. propinquum* com 55,9% e 89,7% e *Rhodococcus equi*

com 10,5% e 7, 9% de certeza pelo sistema semi-automatizado ApiCoryne respectivamente e aguardam identificação genotípica. Os algoritmos do Sistema Api Coryne System e do MALDI-TOF estão caracterizados no **Quadro 2**.

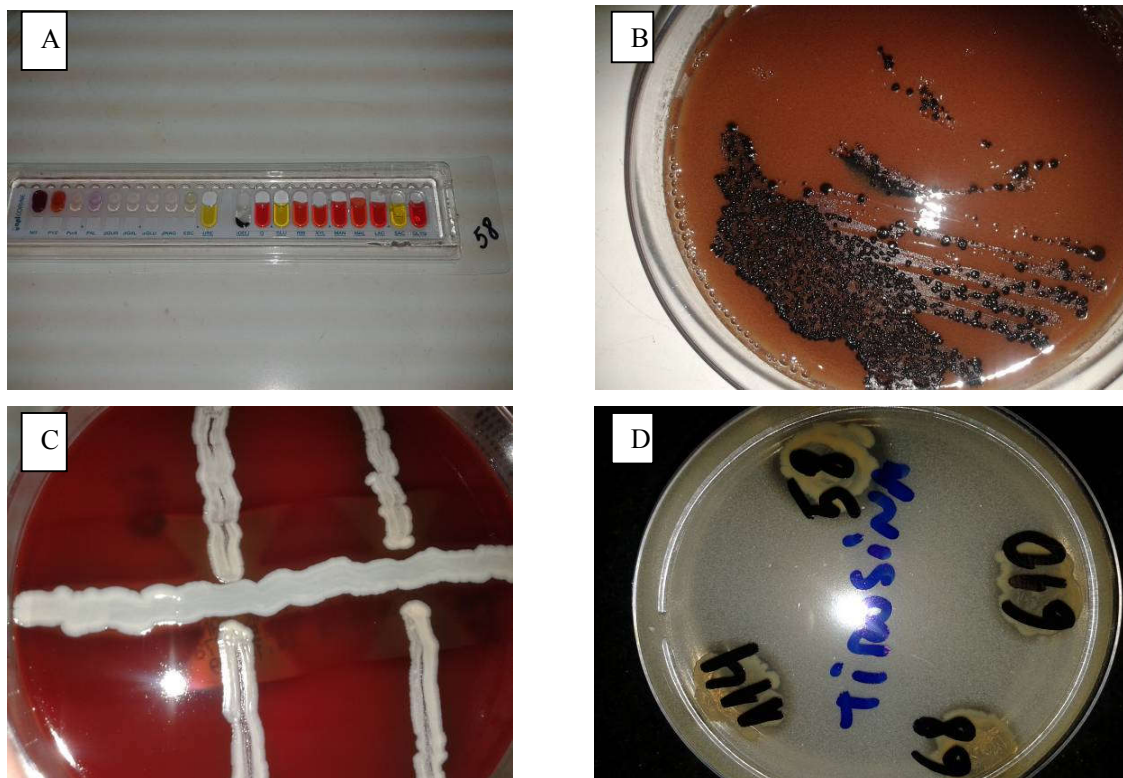
Quadro 1. Aspectos clínico-epidemiológicos de 15 pacientes, internados em Hospital Terciário do Rio de Janeiro, de fevereiro a dezembro de 2015, com hemoculturas positivas para bacilos Gram-positivos (n=15).

Amostra	Coleta	Setor	Comorbidade	Dispositivos médicos	TI* (dia)	Evolução	Sexo/Idade (anos)	Isolado(s)
20	Fev/15	CTI	Convulsão/pneumonia	CAT e TOT	10	Alta	M/20	<i>C. striatum</i> e <i>S. epidermidis</i>
176	Fev/15	150C	ITU	CAT e SU	90	Óbito	M/67	<i>C. propinquum</i> e <i>E. aerogenes</i>
283	Mar/15	DIP	ITR	CAT e TOT	11	Alta	M/52	<i>T. paurometabola</i>
05	Mai/15	COR	Infarto e espessamento de válvula aórtica	CAT, SU e TOT	9	Alta	M/85	<i>B. ravenspurgenae</i>
610	Jun/15	CTI	Pneumonia/Hipotireoidismo	CAT e TOT	60	Óbito	F/73	<i>C. striatum</i>
426	Jul/15	150D	Câncer (pâncreas)	CAT e SU	5	Alta	M/85	<i>Dietzia maris</i> e <i>Burkholderia</i>
58	Ago/15	CTI	Febre/ITU/Sepse	CAT e TOT	120	Óbito	F/74	<i>C. striatum</i>
68	Ago/15	CTI	Febre/ITU/Sepse	CAT e TOT	120	Óbito	F/74	<i>C. striatum</i>
114	Ago/15	CTI	IRA	CAT e TOT	45	Óbito	F/60	<i>C. striatum</i> e <i>S. haemolyticus</i>
306	Ago/15	CTI	IRA	CAT e TOT	45	Óbito	F/60	<i>C. striatum</i>
322	Ago/15	150C	ITU	CAT e SU	10	Alta	F/87	<i>Corynebacterium</i>
326	Ago/15	UER	AVC	CAT	4	Alta	F/82	<i>C. amycolatum</i>
528	Ago/15	150C	Pneumonia	CAT	14	Alta	F/86	<i>C. amycolatum</i>
395	Out/15	CTI	Pneumonia	CAT e TOT	21	Óbito	M/86	<i>C. amycolatum</i>
398	Out/15	CTI	Pneumonia	CAT e TOT	21	Óbito	M/86	<i>C. minutissimum</i>
478	Out/15	150C	Câncer	CAT	20	Óbito	M/67	<i>L. monocytogenes</i>
481	Out/15	150C	Câncer	CAT	20	Óbito	M/67	<i>L. monocytogenes</i>
488	Out/15	150A	ITU	CAT	28	Alta	M/33	<i>C. aurimucosum</i> e <i>E. coli</i>
88	Dez/15	CTI	Choque	CAT e TOT	8	Óbito	F/84	<i>C. striatum</i> e <i>S. capitis</i>

Legenda: CTI, Centro de Tratamento Intensivo; 150, Ala do Setor de Clínica Médica; DIP, Setor de Doenças Infecção-parasitárias; COR, CTI coronariana; UER, Repouso da Unidade de Emergência; *TI, Tempo de Internação; AVC, Acidente Vascular Cerebral; ITU, Infecção do Trato Urinário; ITR, Infecção do Trato Respiratório; IRA, Insuficiência Renal Aguda; CAT, Cateter Venoso; TOT, Tubo Oro-traqueal; SU, Sonda Urinária.

Fonte: A Autora, 2018.

Figura 4: Testes fenotípicos e crescimento em meios de cultivo de *Corynebacterium spp.* isolados de hemoculturas de pacientes internados em Hospital Terciário.



Legenda- A- Sistema semi-automatizado Api-coryne; B- crescimento de colônias de *C. amycolatum* em ágar chocolate telurito (ACT) revelando pigmentação escura devido à redução do Telurito de Potássio; C- Teste de CAMP positivo para amostras de *C. striatum* revelando o sinergismo com a hemolisina de *S. aureus*; D- Prova da Tirosina positiva para amostras de *C. striatum* revelando a formação de halo de hidrólise na periferia do crescimento microbiano.

Fonte: A Autora, 2018

Quadro 2. Identificação das amostras de bacilos Gram-positivos isoladas de hemoculturas de pacientes internados em Hospital Terciário do Rio de Janeiro, de fevereiro a dezembro de 2015, através dos métodos convencionais, Sistema semi-automatizado Api Corine e MALDI-TOF a partir de culturas mono e polimicrobianas (n=19).

Amostra	<u>ApiCoryne</u>		<u>MALDI-TOF</u>		Microorganismos isolados em	
	Espécie	código	Espécie	Score	Agar Sangue	ACT
20	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100105	<i>C. striatum</i>	2.342	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. striatum</i> e <i>S. epidermidis</i>
176	<i>C. propinquum</i>	1100004	NI	1.476	<i>E. aerogenes</i>	<i>C. propinquum</i>
283	<i>Arthrobacter spp.</i>	6550004	<i>T. paurometabola</i>	1.971	<i>T. paurometabola</i>	<i>T. paurometabola</i>
05	<i>C. propinquum</i>	0000004	<i>B. ravensturnensis</i>	2.130	<i>B. ravensturnensis</i>	<i>B. ravensturnensis</i>
610	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2000105	<i>C. striatum</i>	2.377	<i>C. striatum</i> e CGP	<i>C. striatum</i>
426	NR	-	<i>Dietzia maris</i>	2.077	<i>Burkholderia</i> e CGP	<i>Dietzia maris</i>
58	<i>C. accolens/</i> <i>C. striatum/amycolatum</i>	3000105	<i>C. striatum</i>	1.996	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
68	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2100105	<i>C. striatum</i>	1.783	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
114	<i>C. striatum/amycolatum</i>	6000105	<i>C. striatum</i>	2.368	<i>C. striatum</i> e <i>S. haemolyticus</i>	<i>C. striatum</i>
306	<i>C. striatum/amycolatum</i>	2000105	<i>C. striatum</i>	1.967	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
322	<i>C. propinquum</i>	0100004	NI	1.133		<i>Corynebacterium</i>
326	<i>Brevibacterium/</i> <i>C. diphtheriae</i>	0510324	<i>C. amycolatum</i>	2.116	<i>C. amycolatum</i> e <i>S. epidermidis</i>	<i>C. amycolatum</i>
528	<i>C. striatum/amycolatum</i>	3100514	<i>C. amycolatum</i>	2.135	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
395	<i>Brevibacterium/</i> <i>C. diphtheriae</i>	1510324	<i>C. amycolatum</i>	2.076		<i>C. amycolatum</i>
398	NR	-	<i>C. minutissimum</i>	2.146		<i>C. minutissimum</i>
478	NR	-	<i>L. monocytogenes</i>	2.298	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
481	NR	-	<i>L. monocytogenes</i>	2.344	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
488	NR	-	<i>C. aurimucosum</i>	2.089	<i>E. coli</i>	<i>C. aurimucosum</i>
88	NR	-	<i>C. striatum</i>	2.385	<i>S. capitis</i>	<i>C. striatum</i>

Legenda: NR; Ensaio não realizado; NI; Não identificado; CGP, Cocos Gram positivos; , sem crescimento após 48 horas de incubação.

Fonte: A Autora, 2018.

4.2.2 Análise dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos

Todas as amostras de *C. striatum* (HCEBR-20, HCEBR-58, HCEBR-68, HCEBR-114, HCEBR-306, HCEBR-610, HCEBR-88) mostraram resistência a todos os antimicrobianos testados (perfil de multirresistência - MDR), exceto para Linezolida, Vancomicina e Tetraciclina (Quadro 3).

As amostras identificadas como *C. amycolatum* (HCEBR-326, HCEBR-395 e HCEBR-528) revelaram perfis de susceptibilidade diversos frente aos antimicrobianos testados.

Quadro 3. Perfis de susceptibilidade de amostras de *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium amycolatum* aos agentes antimicrobianos avaliados pelo teste de difusão em disco (n=10).

Espécie	<i>Corynebacterium striatum</i>					<i>C. amycolatum</i>		
Antimicrobiano	BR20	BR58/68	BR88	BR114/306	BR610	BR326	BR395	BR528
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	S
Amoxilina/Clavulanato	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	S
Ampicilina/Sulbactam	R	R	R	R	R	R	S	S
Cefotaxima	R	R	R	R	R	S	S	S
Ceftriaxona	R	R	R	R	R	S	S	S
Cefepime	R	R	R	R	R	S	S	S
Metilicina	R	R	R	R	R	S	S	S
Imipenem	R	R	R	R	R	S	S	S
Gentamicina	R	R	R	R	R	S	S	S
Tobramicina	R	R	R	R	R	S	R	S
Rifampicina	R	R	R	R	R	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S	R	S	R
Eritromicina	R	R	R	R	R	R	R	R
Azitromicina	R	R	R	R	R	R	R	R
Clindamicina	R	R	R	R	R	I	S	R
Linezolida	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfametox/Trimetoprim	R	R	R	R	R	R	S	R
Ciprofloxacina	R	R	R	R	R	R	S	S
Nitrofurantoína	R	R	R	R	R	R	R	R
Daptomicina	R	R	R	R	R	R	R	R
Mupirocina	R	R	R	R	R	R	R	R
Fosfomicina	R	R	R	R	R	R	R	R
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S

R – Resistente ao antimicrobiano; I – Intermediário; S – Sensível.

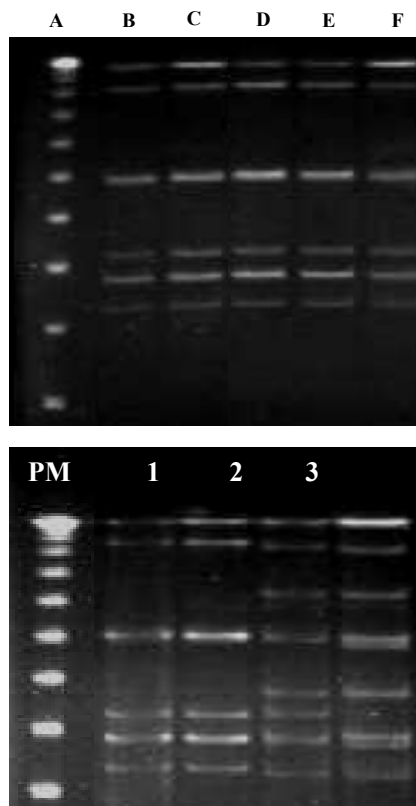
Fonte: segundo Martinez-Martinez et al., 1995; Funke et al., 1997 e CLSI M45, 2014. NR – Não realizado.

4.3 Caracterização Genotípica

4.3.1 Análise do polimorfismo através de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

As cepas identificadas como *Corynebacterium striatum* foram submetidas à análise do polimorfismo do DNA cromossômial através de ensaios de Eletroforese em Campo Pulsado. Os ensaios de PFGE (**Figura 5**) revelaram que todas as amostras pertencem a um único pulsotipo, designado como pulsotipo IC, com base na similaridade observada em relação a amostras oriundas de Hospital Universitário do Estado do Rio de Janeiro.

Figura 5: Eletroforese em campo pulsado de amostras de *Corynebacterium striatum*



Legenda. Eletroforese em campo pulsado de amostras de *Corynebacterium striatum* oriundas de Hospital Terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro. Em A e PM – peso molecular; B - amostra HCE-BR020; C e 1 – HCE-BR058; D e 2 – HCE-BR88; E – HCE-BR306; F – HCE-BR610; 3 - BR2308 (pulsotipo I) e 4 – BR2230 (pulsotipo VI).

Fonte: A Autora, 2018

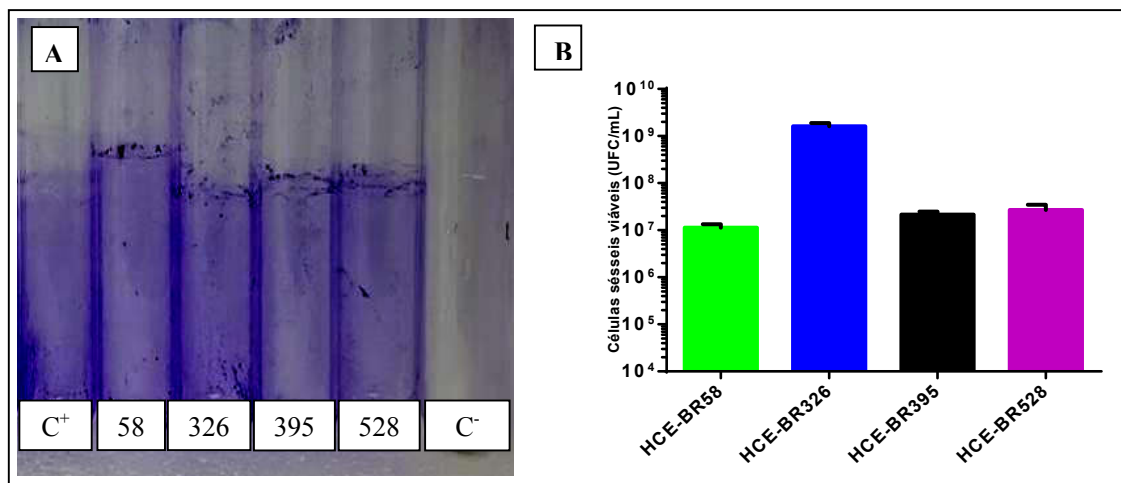
4.4 Caracterização da Virulência

4.4.1 Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico (vidro)

Quanto à capacidade de formar biofilme sobre substrato hidrofílico, todas as cepas de *C. striatum* e *C. amycolatum* estudadas foram capazes de produzir biofilme sobre o vidro apresentando perfis idênticos. A **Figura 6** ilustra a aderência das amostras de *C. striatum* na superfície do vidro.

Apesar das amostras apresentarem perfis idênticos de aderência ao vidro a análise quantitativa da produção de biofilme revelou diferenças entre as cepas analisadas. As cepas *C. amycolatum* HCE-BR326 e *C. striatum* HCE-BR58 revelaram respectivamente, as maiores ($1,67 \times 10^9$ UFC/ml) e menores ($1,13 \times 10^7$ UFC/ml) contagens de formas sésseis viáveis, enquanto as demais cepas, *C. amycolatum* HCE-BR395 ($2,15 \times 10^7$ UFC/ml) e HCE-BR528 ($2,70 \times 10^7$ UFC/ml) não diferiram entre si ($P=0,16$)

Figura 6: Padrões de formação de biofilme em vidro de amostras de *C. striatum* e *C. amycolatum*.



Legenda. Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico (vidro) por cepas *C. striatum* e *C. amycolatum* oriundas de hospital terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro. (A) Análise qualitativa da produção de biofilme em vidro. (C⁺) Cepa *C. diphtheriae* BR-CAT5003 utilizada como controle positivo. (C⁻) Tubo contendo TSB utilizado como controle negativo nesse ensaio. Cepas *C. striatum* HCE-BR58 e *C. amycolatum* HCE-BR326, HCE-BR395 e HCE-BR528 apresentam perfil tipo I. (B) Análise quantitativa da produção de biofilme em vidro. As cepas *C. amycolatum* HCE-BR326 e *C. striatum* HCE-BR58 revelaram respectivamente, as maiores e menores contagens de formas sésseis viáveis, enquanto as demais cepas não diferiram entre si.

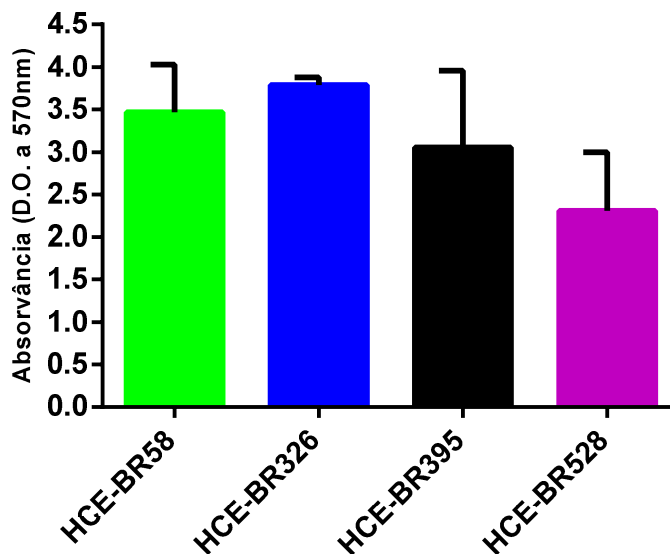
Fonte: A Autora, 2018.

4.4.2 Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno)

Os resultados da análise semiquantitativa da produção de biofilme estão representados pelas médias das densidades ópticas (D.O.) e seus desvios padrões no **Gráfico 1**.

A princípio, todas as amostras analisadas foram fortemente aderentes ao poliestireno ($DO > 4 \times DO_c$). A amostra *C. amycolatum* HCE-BR326 ($3,79 \pm 0,09$) apresentou maior produção ($P < 0,05$) de biofilme enquanto que as demais amostras não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Gráfico 1: Produção de biofilme em poliestireno



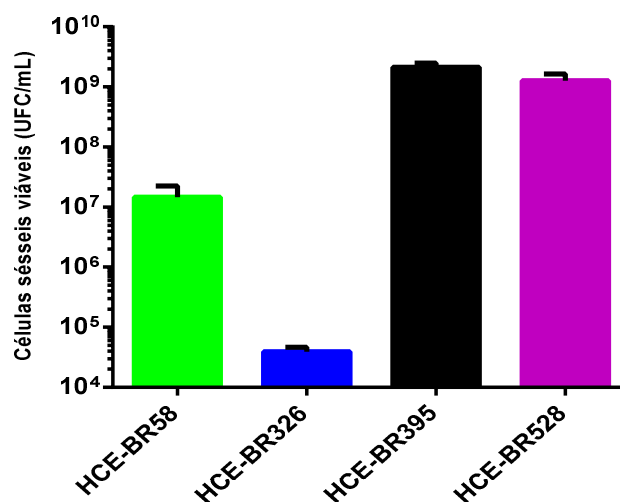
Legenda. Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno) por amostras oriundas de hospital terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro. Análise semiquantitativa da produção de biofilme em poliestireno. Em verde: cepa *C. striatum* HCE-BR58; azul: cepa *C. amycolatum* HCE-BR326; preto: cepa *C. amycolatum* HCE-BR395; rosa: cepa *C. amycolatum* HCE-BR528.

Fonte: A Autora, 2018.

Os resultados da análise quantitativa da produção de biofilme por contagem de células sésseis viáveis (UFC/ml) estão apresentados no **Gráfico 2**, esta análise revelou que todas as amostras estudadas diferem entre si, com maiores valores de viabilidade para as amostras de *C. amycolatum*.

Embora a amostra *C. amycolatum* HCE-BR326 tenha apresentado maior produção de biofilme em poliestireno pela análise semiquantitativa, esta apresentou menores contagens de células sésseis viáveis ($3,88 \times 10^4$ UFC/ml). A amostra *C. amycolatum* HCE-BR395 foi a que apresentou as maiores contagens de células viáveis ($2,12 \times 10^9$ UFC/ml), seguida da amostra *C. amycolatum* HCE-BR528 ($1,27 \times 10^9$ UFC/ml) e finalmente da amostra *C. striatum* HCE-BR58 ($1,47 \times 10^7$ UFC/ml).

Gráfico 2: Análise quantitativa da produção de biofilme em laminulas de Thermanox



Legenda. Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno) por amostras oriundas de Hospital Terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro. Análise quantitativa da produção de biofilme em poliestireno. Em verde: cepa *C. striatum* HCE-BR58; azul: cepa *C. amycolatum* HCE-BR326; preto: cepa *C. amycolatum* HCE-BR395; rosa: cepa *C. amycolatum* HCE-BR528.

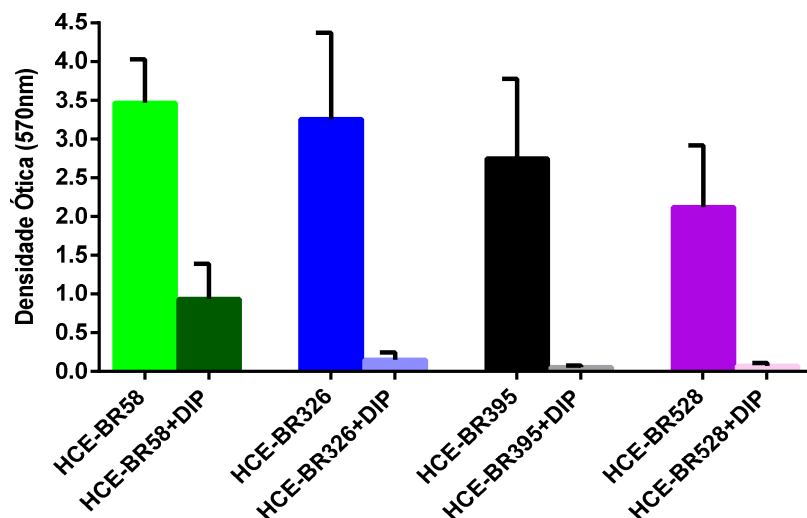
Fonte: A Autora, 2018.

4.4.3 Influência da privação de ferro sobre a produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno)

Os resultados da análise semiquantitativa da produção de biofilme em diferentes concentrações de ferro estão representados pelas médias das densidades ópticas (D.O.) e seus desvios padrões no **Gráfico 3**.

Quando submetidas à privação de ferro, pelo cultivo em meio contendo o quelante 2,2'-dipyridyl, todas as amostras revelaram redução na produção de biofilme através da análise semiquantitativa ($P<0,005$). A amostra *C. striatum* HCE-BR58 ($0,94 \pm 0,45$) apresentou a maior produção ($P<0,001$) de biofilme quando submetida à privação de ferro, seguida ($P<0,005$) da amostra *C. amycolatum* HCE-BR-326 ($0,15 \pm 0,09$). As amostras *C. amycolatum* HCE-BR395 ($0,06 \pm 0,02$) e HCE-BR528 ($0,04 \pm 0,01$) não diferiram entre si ($P=0,37$).

Gráfico 3: Influência do ferro sobre a produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno)



Legenda. Influência do ferro sobre a produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno) por amostras oriundas de Hospital Terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro. Análise semiquantitativa da produção de biofilme em poliestireno. Em verde: cepa *C. striatum* HCE-BR58; azul: cepa *C. amycolatum* HCE-BR326; preto: cepa *C. amycolatum* HCE-BR395; rosa: cepa *C. amycolatum* HCE-BR528.

Fonte: A Autora, 2018.

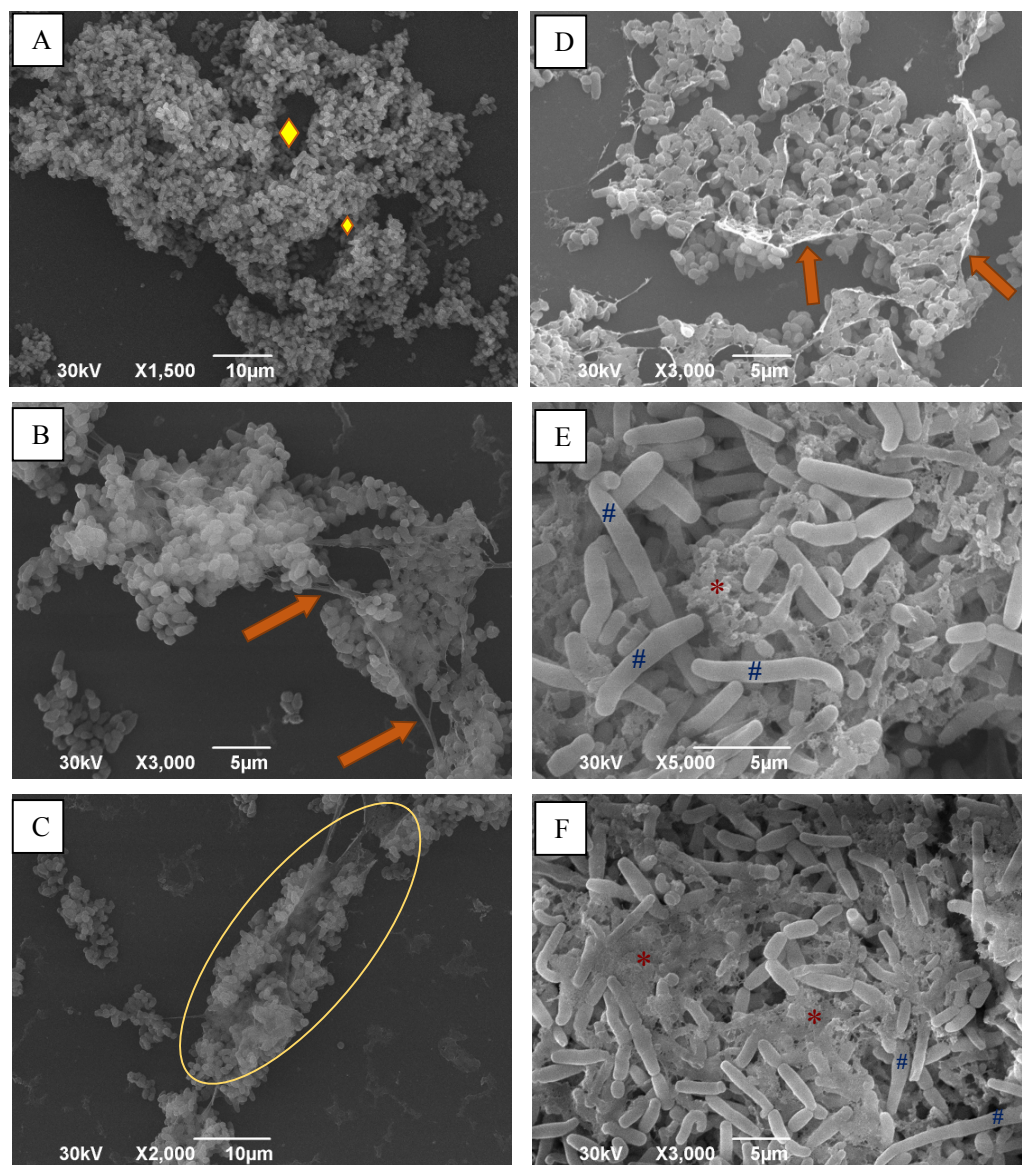
4.4.4 Análise ultraestrutural do biofilme formado através de Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A **Figura 7** revelou a formação de biofilme maduro sobre lamínulas de Thermanox™, em apenas 48h de incubação, para todas as amostras estudadas. A análise ultraestrutural do biofilme formado sobre a superfície hidrofóbica de lamínulas de Thermanox™ permitiu a identificação de massas celulares bacterianas, formando camadas sobrepostas, circundadas por matriz abundante, com aspecto filamentosos, formando, por vezes pontes intercelulares e por outras recobrindo as células bacterianas como lençóis ou mantos. Foi possível identificar a formação de *hollow voids* nas regiões centrais do biofilme maduro.

A amostra *C. striatum* HCE-BR58 apresentou formação com células bacterianas empilhadas com discreta produção de matriz extracelular enquanto que as amostras *C. amycolatum* demonstraram intensa produção de matriz extracelular nas condições de estudo.

Interessantemente, a amostra *C. amycolatum* HCE-BR528 apresentou filamentação das células sésseis com alongamento correspondente a cerca de 5 vezes a dimensão usual, perdendo o aspecto claviforme característico do gênero.

Figura 7: Análise ultraestrutural do biofilme formado através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)



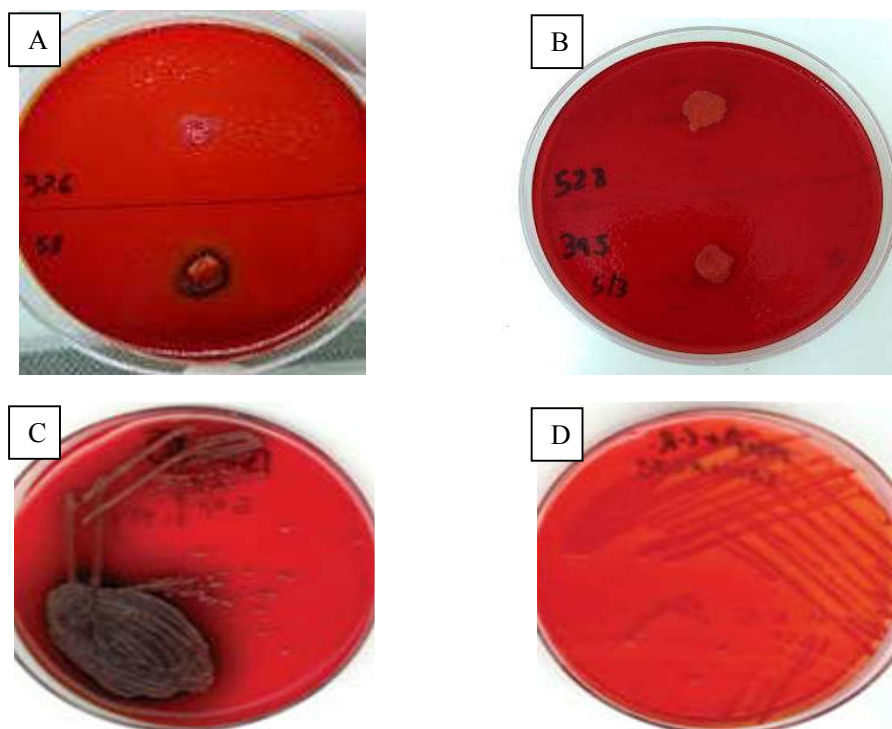
Legenda. Micrografias eletrônicas de varredura (A-F) demonstrando a formação de biofilme na superfície hidrofóbica de laminulas de Thermanox™ (48h de incubação) pelas amostras de *Corynebacterium striatum* HCE-BR58 (A) e *Corynebacterium amycolatum* HCE-BR326 (B e C), HCE-BR395 (D) e HCE-BR528 (E e F). , Canais internos do biofilme (voids); →, matriz extracelular formando filamentos intercelulares; 0, matriz extracelular formando manto sobre as células bacterianas; *, matriz extracelular formando estrutura com aspecto reticular; #, célula bacteriana com filamentação.

Fonte: A Autora, 2018

4.4.5 Análise da natureza polissacarídica do biofilme através da produção de *slime* em meio Vermelho do Congo

Dentre as amostras estudadas, somente a amostra *C. striatum* HCE-BR58 apresentou pigmentação escura após crescimento em meio Vermelho do Congo, contudo esta ocorreu apenas na periferia do crescimento (*spot*) formando um fino halo (**Figura 8**).

Figura 8: Análise da produção de *slime* pelo método do Agar vermelho do Congo



Legenda. Produção de *slime* pelo método do agar vermelho do Congo. Amostras crescidas em Agar Vermelho do Congo. Em A – amostras clínicas *C. striatum* HCE-BR58 (*spot* inferior, apresentando pigmentação escura) e *C. amycolatum* HCE-BR326 (*spot* superior, com coloração rósea). B – amostras clínicas *C. amycolatum* HCE-BR395 e HCE-BR528 (*spots* superior e inferior, ambos com coloração rósea). C – Controle positivo *S.epidermidis* ATCC 35984 (colônias com reverso escuro) e D - Controle negativo *S.epidermidis* ATCC 1228 (colônia rosa/avermelhada).

Fonte:A Autora, 2018

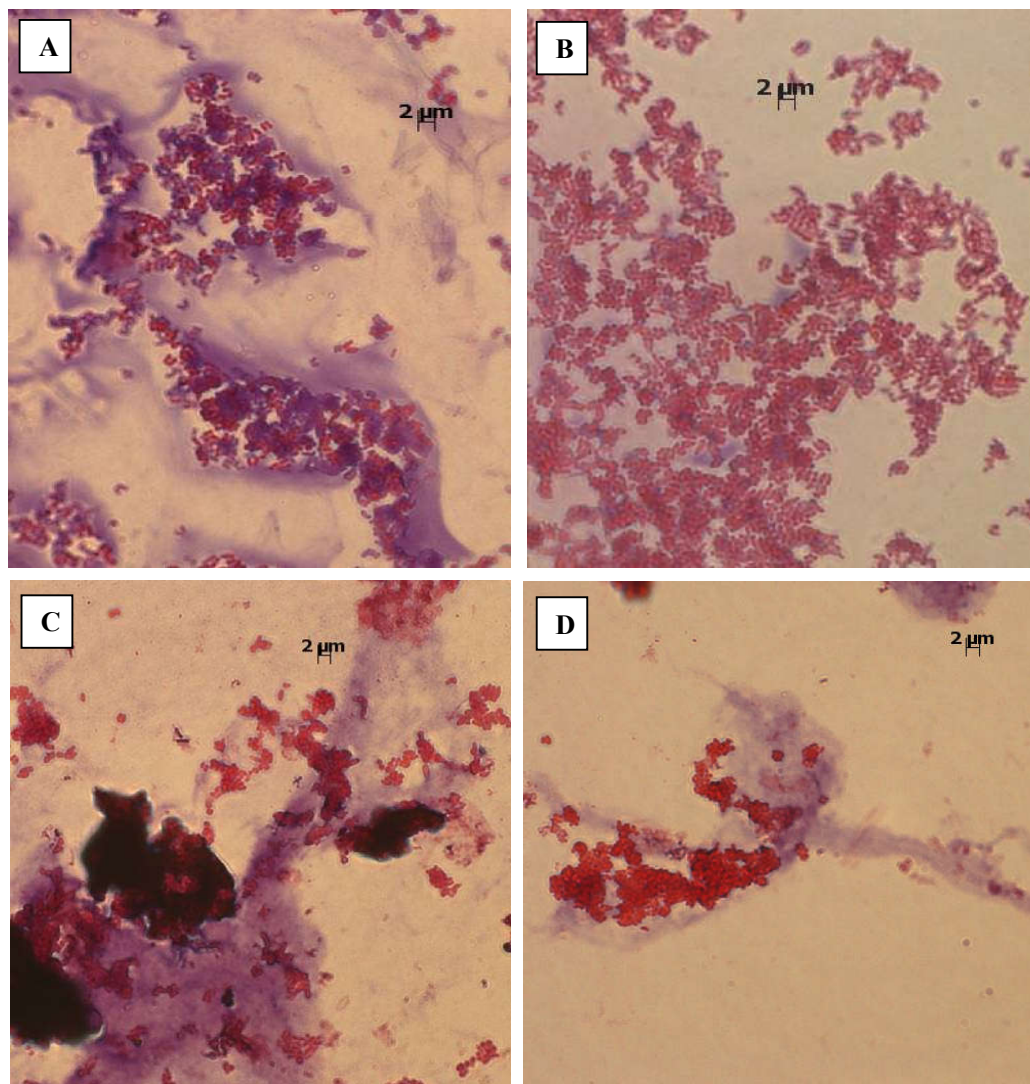
4.4.6 Análise qualitativa da composição química do biofilme através da coloração com Safranina e Comassie blue

Ensaio preliminares demonstraram que os corantes (Comassie blue e Safranina) foram capazes de se ligar à biomassa do biofilme bacteriano sem se ligarem ao substrato (lamínulas de Thermanox™).

A coloração pelo Comassie blue revelou a natureza proteica dos biofilmes formados após 24 horas de incubação (biofilme maduro) sobre lamínulas de Thermanox™ para as amostras estudadas conforme registrado na **Figura 9**.

As imagens revelaram extensa pigmentação de material extracelular, sugerindo relevante contribuição de proteínas, na composição da matriz exopolimérica do biofilme bacteriano, para a amostra *C. striatum* HCE-BR58 e amostras *C. amycolatum* HCE-BR395 e HCE-BR528. Diferentemente, a amostra *C. amycolatum* HCE-BR326 apresentou discreta captação do corante. A coloração pela safranina revelou a extensa participação de polissacarídeos aparentemente justapostos às células bacterianas para todas as amostras estudadas.

Figura 9: Análise qualitativa do biofilme por coloração com Safranina e Comassie blue



Legenda: Biofilmes formados na superfície hidrofóbica de lamínulas de Thermanox™ (24h de incubação) pelas amostras *Corynebacterium striatum* HCE-BR58 (A) e *Corynebacterium amycolatum* HCE-BR326 (B), HCE-BR395 (C) e HCE-BR528 (D).

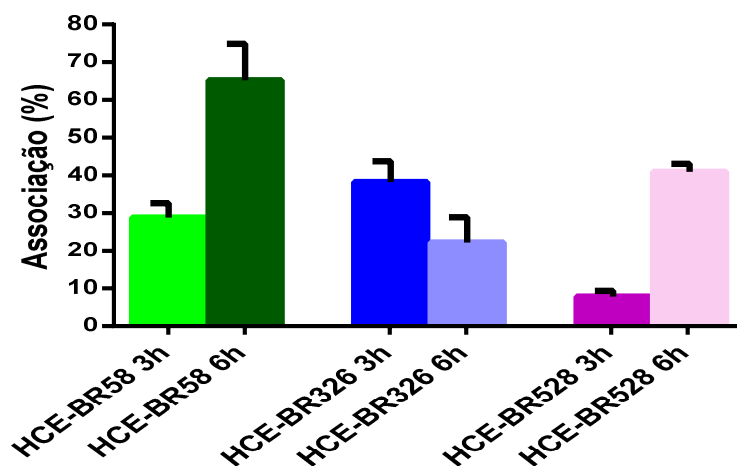
Fonte: A Autora, 2018

4.4.7 Interação com superfícies bióticas

4.4.7.1 Interação, viabilidade e persistência bacteriana em células epiteliais respiratórias humanas (A 549)

Investigamos a capacidade de aderir à superfície de células epiteliais respiratórias humanas A549 (pneumócitos), com períodos de incubação de 3 e 6 horas, com a MOI de 100. Os resultados estão apresentados no **Gráfico 3**. Todas as amostras analisadas foram capazes de interagir com as células epiteliais com intensidades variadas. Dentre as amostras analisadas apenas *C. amycolatum* HCE-BR326 ($38,26 \pm 5,51\%$) apresentou valores máximos de interação no período de 3 horas, inclusive, apresentando os valores mais elevados em relação à amostra *C. amycolatum* HCE-BR528 ($7,86 \pm 1,48$) e *C. striatum* HCE-BR58 ($28,86 \pm 3,77$). Após 6 horas de incubação, as amostras apresentaram elevados percentuais de associação (acima de 40%), com exceção da HCE-BR326 cuja associação encontrou-se em declínio ($22,18 \pm 6,70$). Neste período, a amostra *C. striatum* HCE-BR58 ($65,19 \pm 9,73$) apresentou os maiores valores de associação ($P < 0,0001$), com aumento de mais de 100% ao longo do tempo, similarmente a amostra HCE-BR528 ($40,94 \pm 7,86$) apresentou expressivo crescimento (superior a 500%).

Gráfico 4: Interação bacteriana com células epiteliais respiratórias humanas (A549)



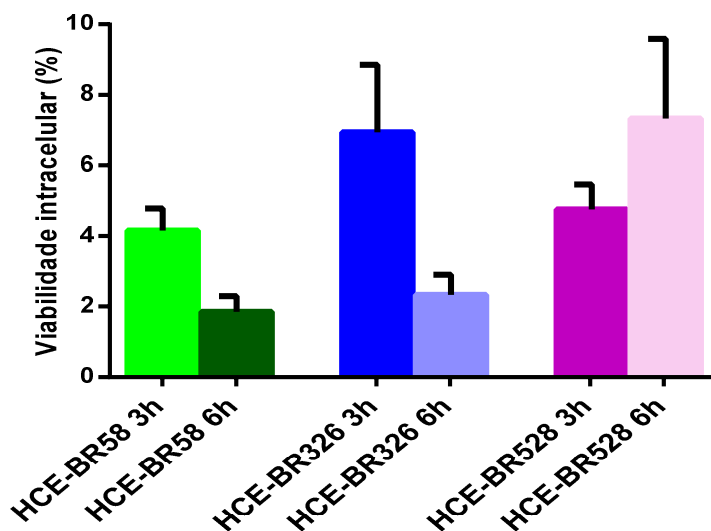
Legenda. Análise quantitativa da interação de corinebactérias oriundas de hospital terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro com células epiteliais humanas de linhagem A549 utilizando a MOI de 100. Os valores estão representados pelas médias dos percentuais de associação acrescidos de seus respectivos desvios padrões, obtidos em experimentos independentes realizados em triplicata. Em verde: cepa *C. striatum* HCE-BR58; azul: cepa *C. amycolatum* HCE-BR326 rosa: cepa *C. amycolatum* HCE-BR528.

Fonte: A Autora, 2018.

Quanto à habilidade permanecer viável no interior de células epiteliais respiratórias humanas, todas as amostras foram capazes de sobreviver nos períodos de interação avaliados, com intensidades diversas. Os resultados estão apresentados no **Gráfico 5**.

A amostra *C. amycolatum* HCE-BR326 ($6,94 \pm 1,91$) apresentou os percentuais mais elevados de viabilidade intracelular após 3h de incubação ($P < 0,005$). As amostras *C. striatum* HCE-BR58 ($4,15 \pm 0,63$) e *C. amycolatum* HCE-BR 528 ($4,75 \pm 0,70$) não diferiram entre si, neste período ($P = 0,15$). As amostras *C. amycolatum* HCE-BR326 e *C. striatum* HCE-BR58 apresentaram redução da viabilidade intracelular ao longo do tempo, chegando a não diferirem entre si ($P = 0,13$) após 6 horas de incubação atingindo os percentuais de $2,33 \pm 0,57$ e $1,85 \pm 0,44$ respectivamente. Por outro lado, a amostra *C. amycolatum* HCE-BR 528 revelou aumento significativo ($P < 0,05$) da viabilidade no mesmo período atingindo a média percentual de $7,33 \pm 2,26$.

Gráfico 5: Viabilidade intracelular de corinebactérias em pneumócitos (A549)



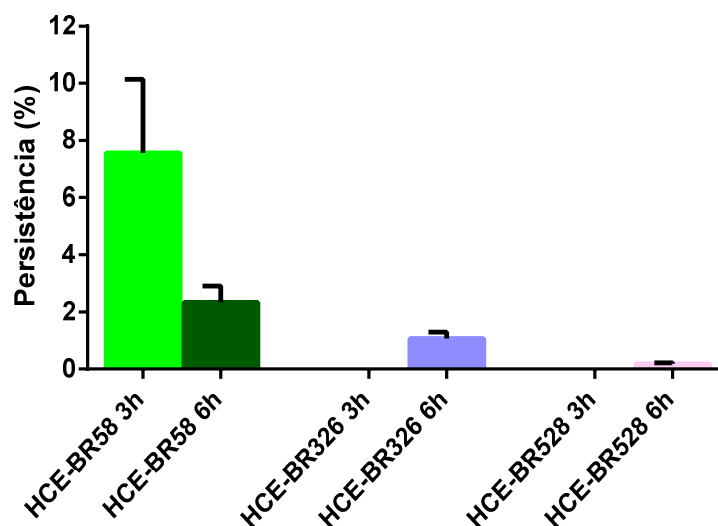
Legenda. Análise quantitativa da viabilidade intracelular de corinebactérias oriundas de Hospital Terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro em células epiteliais humanas de linhagem A549 utilizando a MOI de 100. Os valores estão representados pelas médias dos percentuais de viabilidade intracelular acrescidos de seus respectivos desvios padrões, obtidos em experimentos independentes realizados em triplicata. Em verde: cepa *C. striatum* HCE-BR58; azul: cepa *C. amycolatum* HCE-BR326 e rosa: cepa *C. amycolatum* HCE-BR528.

Fonte: A Autora, 2018.

A análise da persistência (**Gráfico 6**) revelou que todas as amostras foram capazes de persistir no interior de células epiteliais respiratórias humanas após 6 horas de incubação com intensidades diversas.

Apenas a amostra *C. striatum* HCE-BR 58 ($7,57 \pm 2,58$) foi capaz de persistir no interior de células A549 após 3 horas de incubação. Após 6 horas de incubação observamos redução significativa dos percentuais de persistência ($P < 0,001$) para essa amostra ($2,33 \pm 0,57$). Interessantemente, as amostras *C. amycolatum* HCE-BR326 ($1,07 \pm 0,22$) e HCE-BR528 ($0,19 \pm 0,02$) apresentaram persistência tardia em comparação à amostra *C. striatum*.

Gráfico 6: Análise quantitativa da persistência bacteriana em pneumócitos (A549)



Legenda. Análise quantitativa da persistência de corinebactérias oriundas de Hospital Terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro em células epiteliais humanas de linhagem A549 utilizando a MOI de 100. Os valores estão representados pelas médias dos percentuais de viabilidade intracelular, após 24 horas de exposição das monocamadas ao antimicrobiano, acrescidos de seus respectivos desvios padrões, obtidos em experimentos independentes realizados em triplicata. Em verde: cepa *C. striatum* HCE-BR58; azul: cepa *C. amycolatum* HCE-BR326 e rosa: cepa *C. amycolatum* HCE-BR528.

Fonte: A Autora, 2018.

4.4.7.2 Interação bacteriana com modelo helminto (*Caenorhabditis elegans*)

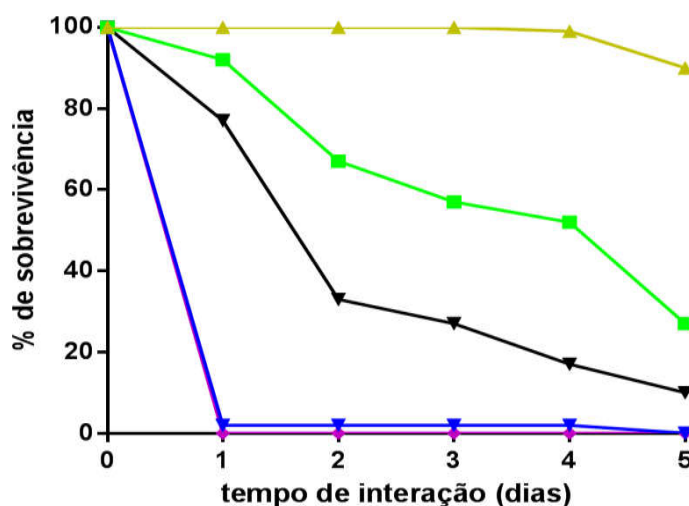
A análise da interação bacteriana com o modelo helminto (**Gráfico 7**) revelou que todas as amostras estudadas foram capazes de comprometer a viabilidade dos helmintos em intensidades e tempos de forma diversa.

As amostras *C. amycolatum* HCE-BR326 e HCE-BR528 mostraram-se mais letais para o helminto, eliminando 100% das populações teste em apenas 24 horas. Esses resultados indicam maior potencial de patogenicidade para essas amostras.

A amostra *C. amycolatum* HCE-BR395 ocupou a segunda posição em relação ao potencial patogênico eliminando 67% e 90% da população de helmintos em 3 e 5 dias de interação, respectivamente.

A amostra *C. striatum* 58 apresentou o menor potencial de patogenicidade eliminando 48% e 73% da população de helmintos em 4 e 5 dias de interação, respectivamente.

Gráfico 7: Interação bacteriana com modelo helminto *Caenorhabditis elegans*



Legenda. Ensaio de sobrevivência de *C. elegans* frente a corineobactérias oriundas de Hospital Terciário da região metropolitana do Rio de Janeiro. Os valores estão representados pelas médias dos percentuais de sobrevivência de populações de helmintos, obtidos em experimentos independentes realizados em triplicata. Em ouro: cepa *Escherichia coli* OP50 (controle negativo); verde: cepa *C. striatum* HCE-BR58; azul: cepa *C. amycolatum* HCE-BR326 e rosa: cepa *C. amycolatum* HCE-BR528.

Fonte: A Autora, 2018.

4.4.7.3 Infecção experimental utilizando o modelo murino (camundongos Swiss Webster)

A infecção em modelo experimental murino reafirmou o potencial patogênico das amostras testadas. Embora não tenham sido observados sinais de artritogênese ou dermonecrose, alterações hematológicas foram registradas para todos os animais infectados.

Inicialmente, 75% dos animais infectados apresentou leucometria global aumentada (leucocitose) no oitavo dia após a infecção com valores variando entre 8.000 e 9.900 células/mm³. O grupo de infectado pela amostra *C. amycolatum* HCE-BR395 (6.667±273,2) apresentou o menor número de animais com leucocitose (33,3%) e foi o único com maioria de animais apresentando valores normais para este parâmetro. Os grupos infectados pelas amostras *C. striatum* HCE-BR58 (8.467± 642,9) e *C. amycolatum* HCE-BR326 (8.467± 986,6) apresentaram 100% de animais com leucocitose e seus valores médios de leucometria não diferiram entre si. O grupo de infectado pela amostra *C. amycolatum* HCE-BR528 apresentou leucometria global média de 7.800±2.265 células/mm³ e não diferiu dos demais grupos.

A avaliação das populações de leucócitos revelou que todos os animais infectados apresentaram neutrofilia e monocitose absolutas e, à exceção do grupo infectado pela amostra *C. amycolatum* HCE-BR395, todos os animais apresentaram linfocitose absoluta. Vale informar que nesse grupo um terço dos animais apresentou linfocitose absoluta, contudo, os grupos infectados não diferiram entre si quanto às contagens médias de linfócitos, que variaram entre 3.963±312,8 e 4.967±403,9 células/mm³. O mesmo ocorreu para as contagens de neutrófilos, que variaram entre 1.923±267,2 e 3.143±473,2 células/mm³ e de monócitos, que variaram entre 302±246,9 e 781±87,92.

As infecções pelas amostras estudadas não foram capazes de produzir alterações na hematimetria, hemoglobinemias e plaquetometria, nas condições de estudo.

5 DISCUSSÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde constituem motivo de preocupação não só para os profissionais de saúde, mas principalmente para todos os usuários do sistema de saúde público ou privado. Cada vez mais, doenças de curso crônico e/ou imunossupressoras, permitem a emergência de novas patologias ou a reemergência de antigas doenças. O ambiente hospitalar torna-se local propício para albergar e transmitir micro-organismos, não apenas com propriedades patogênicas, como também oportunistas, que a cada dia trazem novos desafios para a prática clínica e o controle das infecções. Neste contexto, é importante ressaltar que as corinebactérias foram negligenciadas devido ao fato de assumi-las historicamente como meros contaminantes, por falta de conhecimento dos profissionais de saúde acerca dos potenciais de patogenicidade das amostras, além da dificuldade do isolamento a partir de materiais clínicos. Ocorre, porém, que com o surgimento de novas tecnologias de diagnóstico rápido como o MALDI-TOF, foi possível detectar, isolar e analisar a importância destes micro-organismos na transmissão de infecções nosocomiais.

A caracterização através do sequenciamento de proteínas por MALDI-TOF forneceu a identificação com precisão similar aos métodos moleculares genéticos em nível de gênero e espécie para as corinebactérias. Entretanto, a maioria das abordagens com identificação pelo MALDI-TOF têm se baseado em apenas algumas categorias de micro-organismos através de bases fenotípicas e genotípicas (Gaillot *et al.*, 2011). Exemplos de estudos avaliando a precisão dos métodos diagnósticos mencionam as limitações na diferenciação entre *Streptococcus pneumoniae* e estreptococos do grupo *mitis*. Da mesma forma, existem dificuldades na diferenciação entre cepas de *Shigella* e *Escherichia coli* que podem ser transpostas pela utilização de testes bioquímicos adicionais (Tan *et al.*, 2012). Na prática atual, a principal vantagem da aplicação da técnica de MALDI-TOF consiste na praticidade e agilidade na identificação, uma vez que, o espectro de massa obtido requer apenas uma pequena quantidade de micro-organismos, podendo ser diretamente realizado a partir de apenas uma colônia bacteriana. A partir da introdução da metodologia no Hospital Militar Terciário, foi possível identificar com precisão as amostras isoladas das hemoculturas dos pacientes, onde houve correlação positiva com os testes fenotípicos. A grande variedade de espécies do gênero *Corynebacterium* exige conhecimento e experiência profissional para o seu correto diagnóstico. Algumas espécies como *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium amycolatum* por apresentarem

comportamento fenotípico similar são agrupadas em um complexo (Complexo *Corynebacterium* XSMA) devido à dificuldade de diferenciação (Letek *et al.*, 2006); muitas vezes os testes bioquímicos convencionais e alguns sistemas semi e automatizados de galerias não são capazes de diferenciar essas espécies, comprometendo os processos de identificação.

Ramos (2014), a partir da caracterização fenotípica convencional, identificou quanto à espécie, apenas 46,81% (22/47) das estirpes do gênero *Corynebacterium* testadas. Para Mota (2014) os testes fenotípicos convencionais e o sistema semi-automatizado API Coryne foram definitivamente incapazes de identificar os micro-organismos como *C. striatum* não permitindo a distinção dentro do Complexo XSMA. Dentre as amostras identificadas no presente estudo, somente uma amostra (*C. striatum* HCE-BR68) obteve *score* inferior a 1.9 (1.783) e mesmo assim, permitiu a identificação no nível de espécie, que foi confirmada através da bioquímica convencional somada a provas complementares (CAMP, hidrólise da tirosina e sensibilidade ao O129). Assim como estabelecido por YANG e colaboradores (2015), *C. striatum* foi uma das principais espécies bacterianas envolvidas em processos infecciosos em pacientes do CTI.

Ao longo dos últimos anos, viemos observando o crescimento significativo na quantidade de trabalhos utilizando o MALDI-TOF para a identificação de bacilos Gram positivos (Bernard, 2012). A aplicabilidade do MALDI-TOF para as corinebactérias foi observada para várias espécies sendo reconhecida como uma ferramenta eficiente para identificação na rotina diagnóstica (Seng *et al.*, 2009; Alatoon *et al.*, 2012; Barberis *et al.*, 2014). Estudo anterior encontrou uma precisão de 99,1% na identificação correta entre cepas clínicas potencialmente toxigênicas de *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* com valores preditivos positivos e negativos de 100% utilizando a base de dados do sistema Bruker (Konrad *et al.*, 2010). GOMILA e colaboradores (2012) evidenciaram a eficácia da identificação de *C. striatum* pela técnica MALDI-TOF confirmada pelo sequenciamento de genes conservados *16S rRNA* e *rpoB*.

Segundo SUWANTARAT e colaboradores (2016), o uso de espectrometria de massa MALDI-TOF permite que *C. striatum* seja rapidamente identificado ao nível de espécie com um alto grau de confiança sem necessidade de técnicas moleculares, representando um avanço na identificação deste agente em ambientes clínicos.

VERROKEN e colaboradores (2014) realizaram a identificação de *C. striatum* do trato respiratório inferior de dez pacientes internados em uma mesma UTI, através de MALDI-TOF e demonstraram que métodos proteômicos são capazes não apenas de identificar amostras clínicas destes micro-organismos, como também de determinar capacidade das amostras de

albergar genes que medeiam a resistência microbiana entre amostras isoladas de surtos, constituindo uma técnica promissora no diagnóstico e na origem clonal das amostras.

BARBERIS e colaboradores (2014) demonstraram que, com o advento de uma etapa de extração a técnica de MALDI-TOF permitiu a identificação da maioria das espécies de Bacilos Gram Positivos, incluindo aqueles pertencentes aos gêneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Listeria*, *Dietzia* e *Gordonia*. Similarmente, a utilização do MALDI-TOF neste trabalho permitiu a identificação da maioria das amostras de bacilos Gram positivos (89,5%), incluindo espécies dos gêneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Brevibacterium*, *Listeria* e *Tsukamurella*.

Nossos resultados reiteram a eficácia da técnica de MALDI-TOF para a identificação de BGP, oferecendo uma importante alternativa para o diagnóstico clínico-laboratorial das corinebacterioses com precisão e agilidade. Vale ressaltar que esta permitiu a identificação no nível de espécie mesmo para amostras de difícil distinção, como aquelas pertencentes ao complexo *Corynebacterium* XSMA, que foram identificadas no nível de complexo ou erroneamente pelo sistema semi-automatizado API CORYNE.

Na presente investigação, observamos ainda que o isolamento através do uso de meio de cultura seletivo (Ágar Chocolate Telurito) e a incubação por tempo mínimo de 48h foram fundamentais para o isolamento das amostras de corinebactérias.

Bactérias do gênero *Corynebacterium* podem colonizar seres humanos e animais e são encontradas amplamente distribuídas no meio ambiente natural. Diversas espécies de difteróides já foram descritas como potencialmente virulentas e capazes de atuar como agentes etiológicos de infecções comunitárias e hospitalares, ganhando, portanto, destaque no cenário mundial e preocupando as equipes de saúde e os epidemiologistas (Otsuka *et al.*, 2006, Oliva *et al.*, 2010, Baio *et al.*, 2013).

O estabelecimento de *Corynebacterium* spp. como patógenos ainda é controverso para a maioria dos autores dedicados ao estudo dos processos infecciosos comunitários e hospitalares, contudo *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium amycolatum* vêm sendo identificadas como responsáveis por casos de pneumonia e traqueobronquite associadas à ventilação mecânica, bacteremias e sepses relacionadas ao uso de dispositivos médicos, infecções de feridas, entre outros (Martinez-Martinez *et al.*, 1995; Campanile *et al.*, 2009, Nudel *et al.*, 2017). A depreciação do isolamento de *C. striatum* em materiais clínicos tem sido causa de preocupação na última década, quando este micro-organismo foi reconhecido como um patógeno hospitalar envolvido em casos de endocardite infecciosa e artrite (Boltin *et al.*, 2009). Embora amostras de corinebactérias ainda sejam descartadas como contaminantes

em muitos laboratórios, estudos mais recentes que levam em conta o pirosequenciamento de micro-organismos presentes em lavados bronco-alveolares, verificaram que o gênero *Corynebacterium* estava presente como um dos gêneros mais comuns em pneumonias associadas à ventilação mecânica em pacientes chineses (Yang *et al.*, 2015). Estes e outros relatos demonstram o significado clínico das espécies do gênero *Corynebacterium* em infecções de trato respiratório baixo e reforçam a espécie como um patógeno emergente putativo.

De acordo com a OMS (2012), o ambiente hospitalar favorece o aparecimento e a disseminação de bactérias resistentes. As medidas de prevenção e controle de infecções destinam-se a prevenir a propagação de patógenos, incluindo aqueles com resistência antimicrobiana dentro e entre unidades de saúde e instalações comunitárias e vice-versa. Intervenções para promover mudanças individuais em unidades de saúde envolvem estruturas organizacionais, recursos humanos, diretrizes, protocolos e práticas de monitoramento e avaliação, infraestrutura e ligações com serviços públicos de saúde. Adicionalmente às medidas padrão de prevenção e controle de infecção, existem recomendações específicas sobre patógenos resistentes.

Os hospitais são ambientes extremamente expostos a diversos antibióticos, criando uma pressão seletiva sobre a sobrevivência de bactérias resistentes, através das quais genes de resistência podem ser transferidos para bactérias suscetíveis, espalhando a multirresistência. Tem sido sugerido que esta pressão seletiva favorece o crescimento excessivo de *C. striatum* como um colonizador secundário em hospedeiros imunocomprometidos (Leonard *et al.*, 1994), de modo que *C. striatum* é considerado um agente patogênico nosocomial multirresistente (Fernandez Guerrero *et al.*, 2013). Neste contexto, o surgimento de estirpes resistentes a múltiplas drogas é uma preocupação particular, porque as opções terapêuticas para o tratamento de doentes graves pode ser limitada, aumentando a dependência da vancomicina, que ainda é ativa contra praticamente todos os isolados clínicos de *C. striatum*. A eficácia terapêutica da vancomicina pode ser melhorada se for combinada com um segundo antibiótico, na maioria das vezes um aminoglicosídeo. Assim, vários casos de endocardite por *C. striatum* foram tratados com sucesso com gentamicina combinada com vancomicina (Rufael *et al.*, 1994; Marull *et al.*, 2008). Portanto, os aminoglicosídeos são considerados antibióticos complementares para o tratamento de infecções por *C. striatum*. Há uma necessidade de mais estudos acerca de isolados clínicos, para avaliar o risco de emergência de cepas de *C. striatum* resistentes a antimicrobianos e para rastrear a transferência de genes de resistência (Alibi *et al.*, 2016).

As doenças associadas às corinebactérias não-diftéricas têm sido cada vez mais observadas e, muitas vezes, representam um enigma para o médico responsável pelo tratamento. A análise dos dados do teste de sensibilidade aos antibióticos para 1.970 isolados clínicos de *Corynebacterium* recebidos entre 2011 e 2016 revelou que as opções de tratamento medicamentoso empírico estão limitadas à vancomicina e linezolida. *Corynebacterium striatum* foi a espécie mais frequentemente observada durante este período de estudo, juntamente com *C. Amycolatum*, *C. Pseudodiphtheriticum* e *C. propinquum*. Foram observados níveis baixos de suscetibilidade à penicilina (14,5%), eritromicina (15,1%) e clindamicina (8,7%) para espécies de corinebactérias não-diftéricas, enquanto 3,0% dos isolados não foram sensíveis à daptomicina. Da mesma forma, 26,9% e 38,1% dos isolados de *Corynebacterium* foram suscetíveis à ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, respectivamente. Os dados dessa pesquisa mostram uma suscetibilidade muito menor à penicilina do que a relatada anteriormente na literatura e um número crescente de isolados resistentes à daptomicina, destacando a necessidade de estudos contínuos de vigilância acerca dos perfis de resistência aos antimicrobianos, para o manejo adequado do paciente e sucesso do tratamento (Neemuchwala *et al.*, 2018).

Embora, recentemente diversos estudos tenham descrito *C. striatum* como agente infeccioso emergente, muito pouco se sabe sobre os aspectos de virulência das amostras isoladas de processos infecciosos.

De acordo com a classificação adotada por MAGIORAKOS e colaboradores (2012), patógenos que resistem a mais de três classes de antimicrobianos são considerados multirresistentes (MDR) e os demais, são considerados multissensíveis (MDS). Na presente investigação, observamos que todas as amostras de *C. striatum* isoladas apresentaram idêntico perfil multirresistente (MDR), já que apresentaram resistência a quase todos os 24 antimicrobianos testados, apresentando sensibilidade apenas à linezolida, tetraciclina e vancomicina. As amostras de *C. amycolatum* HCE-BR326, HCE-BR395 e HCE-BR528, também apresentaram perfis multirresistentes, já que foram resistentes a pelo menos de 3 classes de antimicrobianos diferentes, embora os perfis tenham apresentado uma variabilidade entre si.

A multirresistência tem sido reportada para amostras de *C. striatum* no Brasil e diversos países, incluindo os EUA (Hahn *et al.*, 2016; Mc Mullen *et al.*, 2017), Itália (Campanile *et al.*, 2009), Bélgica (Verroken *et al.*, 2014), Israel (Boltin *et al.*, 2008), China (Yang *et al.*, 2015), Japão (Qin *et al.*, 2017). Algumas amostras têm demonstrado susceptibilidade somente à vancomicina, linezolida e telavancina, como observado para o *C.*

jeikeium (Goldstein *et al.*, 2004, Mc Mullen *et al.*, 2017). Segundo QIN e colaboradores (2017) amostras de *C. striatum* isoladas de hemoculturas de pacientes hospitalizados apresentaram tendência a serem resistentes a múltiplos antimicrobianos, com exceção da vancomicina.

Um aumento no número de infecções clínicas significativas devidas a *Corynebacterium* spp. tem sido relatado com maior complexidade em pacientes imunossuprimidos e com dispositivos médicos de longa duração. A daptomicina inibe a multiplicação bacteriana por múltiplos mecanismos, incluindo a ação na membrana e interrupção da síntese de parede, resultando na ruptura da parede celular bacteriana com conseqüente perda da viabilidade microbiana. Alguns estudos recentes relataram o desenvolvimento de um alto grau de resistência à daptomicina durante a terapia, sendo três casos de pacientes com infecções por *C. striatum* associadas ao uso de marca-passo em ventrículo esquerdo, resultando em infecção recidivante (Ajmal *et al.*, 2017; Werth *et al.*, 2016; Mc Elvania *et al.*, 2014). Nos estudos supracitados, a resistência emergiu ao longo do tratamento, diferentemente das amostras analisadas nessa pesquisa (*C. striatum* e *C. amycolatum*), que já apresentaram resistência à daptomicina nos testes fenotípicos de sensibilidade aos antimicrobianos.

No presente estudo, avaliamos o perfil de susceptibilidade das amostras de *C. striatum* e *C. amycolatum* isoladas de hemoculturas, aos antimicrobianos pertencentes às principais classes utilizadas na rotina da clínica médica. Em relação às amostras de *C. striatum*, observou-se perfil idêntico de multirresistência às diversas classes de antimicrobianos, sendo as amostras sensíveis somente à vancomicina, linezolida e tetraciclina. Como ficou demonstrado pela técnica de PFGE realizada neste estudo, todas as amostras de *C. striatum* isoladas pertencem ao mesmo pulsotipo (IC), logo, a expressão do mesmo fenótipo em relação à sensibilidade aos antimicrobianos já era esperada. Além disso, verificou-se que esse perfil de multirresistência é semelhante ao observado para o pulsotipo I multirresistente, descrito por BAIO e colaboradores (2013) em amostras oriundas de hospital universitário (terciário) da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Corynebacterium amycolatum, é um isolado clínico que comumente mostra resistência aos antibióticos mais frequentemente utilizados na prática clínica como os beta-lactâmicos, macrolídeos e fluorquinolonas (Funke *et al.*, 1997; Soriano *et al.*, 1995). YOON e colaboradores (2011) relataram um caso de bacteremia causada por *C. amycolatum* que possuía uma mutação no gene *gyrA*, o que conferiu a este micro-organismo um alto nível de resistência às quinolonas. Mutações nos genes da girase são determinantes para a resistência à

quinolonas em amostras de *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium amycolatum* (Sierra *et al.*, 2005).

No que tange aos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *C. amycolatum*, observamos perfis distintos de susceptibilidade, sendo que as três amostras estudadas (HCE-BR326, HCE-BR395, HCE-BR528), foram todas resistentes aos macrolídeos (eritromicina e azitroicina), nitrofurantoína, mupirocina, fosfomicina e daptomicina (lipopeptídeo). Além disso, a amostra de *C. amycolatum* HCE-BR326, apresentou resistência também às penicilinas, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetropim e ciprofloxacina.

O teste de sensibilidade de *C. striatum* é necessário para estabelecer uma terapia específica. Embora estudos iniciais tenham indicado que os isolados clínicos de *C. striatum* eram suscetíveis a uma ampla gama de antibióticos (Soriano *et al.*, 1995; Martinez-Martinez *et al.*, 1996), relatos recentes mostraram aumento na resistência a múltiplos fármacos (Yoo *et al.*, 2016; Hahn *et al.*, 2016; Alibi *et al.*, 2017). Pacientes que sofrem de doenças subjacentes e recebem vários tipos de antibióticos apresentam alto risco de desenvolver infecções oportunistas graves. Estirpes de *C. striatum* resistentes aos fármacos, podem estar na origem de grandes surtos. Cabe ressaltar que, diversos surtos de clones de *C. striatum* resistentes a múltiplos fármacos foram relatados recentemente (Campanile *et al.*, 2009; Baio *et al.*, 2013; Verroken *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Alibi *et al.*, 2017).

Corynebacterium striatum é um patógeno oportunista nosocomial, cada vez mais associado a uma ampla gama de infecções humanas, sendo frequentemente resistente a vários antibióticos.

ALIBI e colaboradores (2017) investigaram a susceptibilidade de 63 amostras de *C. striatum* isoladas no hospital Farhat-Hached, Sousse (Tunísia), durante o período 2011-2014, a um painel de 16 compostos pertencentes às principais classes clinicamente relevantes de agentes antimicrobianos. Todas as amostras foram suscetíveis à vancomicina, linezolida e daptomicina. Amicacina e gentamicina também mostraram boa atividade (CIM90 = 1 e 2 mg / L, respectivamente). Altas taxas de resistência à penicilina (82,5%), clindamicina (79,4%), cefotaxima (60,3%), eritromicina (47,6%), ciprofloxacina (36,5%), moxifloxacina (34,9%) e rifampicina (25,4%) foram observadas. Cinquenta e nove (93,7%) dos 63 isolados apresentaram resistência a pelo menos um composto e 31 (49,2%) foram resistentes a múltiplos fármacos. Vinte e nove perfis de resistência foram distinguidos entre os 59 *C. striatum* resistentes. A maioria das amostras resistentes às fluoroquinolonas mostrou uma dupla mutação levando a uma mudança de aminoácidos nas posições 87 e 91 na região de

determinação de resistência às quinolonas do gene *gyrA*. As 52 amostras resistentes à penicilina foram positivas para o gene *bla*, codificando uma β -lactamase de classe A.

CAMPANILE e colaboradores (2009) isolaram uma amostra de *C. striatum* multirresistente que posteriormente foi correlacionada com a presença de um plasmídeo *pTP10*, que demonstrou que o referido micro-organismo adquiriu não só a capacidade de causar infecção como também de aumentar sua resistência e de se espalhar em virtude de sua natureza clonal. As únicas drogas ainda ativas contra esta amostra multirresistente foram glicopeptídeos, linezolida, quinupristina/dalfopristina, daptomicina e tigeciclina. O autor afirma ainda, que os clínicos devem estar conscientes acerca da circulação de amostras multirresistentes e evitar o uso de drogas aparentemente ativas *in vitro* mas que podem ser ineficazes *in vivo*.

HAHN e colaboradores (2016) documentaram que um fenótipo multirresistente de *C. striatum* afeta diretamente o atendimento clínico. Osteomielites e infecções associadas à próteses são difíceis de tratar, exigindo muitas vezes o uso prolongado de medicamentos antimicrobianos. Em algumas situações, as diretrizes recomendam uma duração limitada da terapia parenteral seguida por um período mais longo de terapia oral (Osmon *et al.*, 2013; Béltran-Arroyave *et al.*, 2015). Espera-se que a falta de opções de tratamento oral bem toleradas e ativas contra *C. striatum* leve a uma duração mais longa do uso de drogas antimicrobianas parenterais para pacientes com essas infecções, e o referido estudo confirmou essa expectativa. Quanto mais tempo a terapia antimicrobiana parenteral for necessária, maior a probabilidade de eventos adversos associados ao acesso intravenoso e maiores são os custos do tratamento. Além disso, terapias parenterais para *C. striatum*, estão cada vez mais limitadas, sendo que vários estudos reportaram falhas no tratamento clínico devido ao rápido desenvolvimento da resistência do *C. striatum* à daptomicina (Werth *et al.*, 2016; Tran *et al.*, 2012; Mc Elvania *et al.*, 2014). A frequente resistência do *C. striatum* aos antimicrobianos orais mais facilmente tolerados reforça a necessidade do desenvolvimento de novos antimicrobianos com boa biodisponibilidade oral e perfis aceitáveis de segurança para protocolos de tratamento a longo prazo contra micro-organismos Gram-positivos (Hahn *et al.*, 2016).

A pressão seletiva exercida por tratamentos antimicrobianos prévios favorece a seleção de corinebactérias multirresistentes como colonizadoras secundárias em pacientes imunocomprometidos (Camello *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2017). É consenso que a resistência bacteriana tem sido um importante fator no aumento dos índices de mortalidade em pacientes criticamente doentes, especialmente aqueles atendidos nas UTIs, que são mais vulneráveis a

serem colonizados ou infectados por microrganismos multirresistentes (Lopez-Pueyo, 2011, Wang *et al.*, 2016). No presente estudo, verificou-se que as bactérias isoladas da placa de ágar sangue, a partir da amostra 114, oriunda de paciente imunocomprometida (nefropata crônica com pneumonia, sob terapia intensiva com ventilação assistida) – *Corynebacterium striatum* e *Staphylococcus haemolyticus* – apresentaram perfil idêntico de sensibilidade aos antimicrobianos testados o que sugere que possa estar ocorrendo transferência de genes de resistência entre estes isolados. A resistência emergente encontrada em *C. striatum* alerta para o fato de que esta espécie pode propagar a resistência a outros micro-organismos e constituir um grave problema de saúde pública, especialmente quando nos ambientes de assistência à saúde.

Segundo TENOVER *et al.*, (1995) bactérias envolvidas em surtos e/ou epidemias, sejam no ambiente noscomial ou comunitário, podem apresentar padrões indistinguíveis, enquanto que, aquelas não envolvidas com a epidemia, em geral, apresentam padrões distintos. Logo, é importante a utilização de linhagens-controle, não relacionadas epidemiologicamente por ocasião da genotipagem. PFGE (*pulsed field gel eletrophoresis*) é a sigla usada para indicar qualquer técnica de eletroforese apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. Esta técnica é reconhecida como padrão ouro para a identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários (Magalhães *et al.* 2005).

Na presente investigação, todas as amostras de *C. striatum* isoladas de hemoculturas foram classificadas como pertencentes ao pulsotipo IC e apresentaram o mesmo perfil multirresistente aos antimicrobianos, sensíveis somente à tetraciclina, vancomicina e linezolida, como observado previamente para o pulsotipo I por Baio e colaboradores (2013). Vale informar que o pulsotipo I foi o predominante entre as amostras isoladas no hospital universitário, a detecção do pulsotipo IC, no HCE, indicou a dispersão deste em diferentes hospitais do Rio de Janeiro/Brasil.

No mesmo período de investigação deste trabalho, outro pulsotipo (pulsotipo XI) foi detectado no HCE (Lima, 2016), em secreção traqueal de paciente sob terapia intensiva, demonstrando que outros pulsotipos podem ser encontrados circulando no mesmo ambiente hospitalar, fato observado também em pesquisas realizadas em outros países, como Bélgica, Japão e China (Verroken *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2017). O pulsotipo XI, embora multirresistente, mostrou-se mais susceptível aos agentes antimicrobianos que o pulsotipo IC.

Enquanto as amostras do pulsotipo IC foram isoladas tanto de secreção traqueal quanto de hemoculturas o pulsotipo XI foi isolado apenas de secreção traqueal o que denota que as amostras do pulsotipo IC, podem invadir e se disseminar além dos sítios pulmonares e causar sepse em pacientes susceptíveis com pneumonia, hospitalizados no CTI em um hospital terciário. A mortalidade associada ao pulsotipo IC (55,6%) entre os pacientes infectados por *C. striatum*, demonstra a propriedade de virulência desse pulsotipo, encontrada de forma similar no pulsotipo I (60%) detectada por Baio e colaboradores em outro hospital do Rio de Janeiro. Além disso o pulsotipo I, também foi capaz de formar biofilme ampliando a resistência a agentes antimicrobianos (Souza *et al.*, 2015; Lima, 2016).

Devido ao fato do gênero *Corynebacterium* colonizar a pele humana, a detecção de *Corynebacterium striatum* em uma amostra de sangue estéril é comumente considerada como contaminante, porém, estudo recente (Masuda *et al.*, 2017), relatou que um homem de 80 anos submetido à cirurgia cardiovascular, apresentou febre alta no pós-operatório. Foi detectado *C. striatum* no sangue e no exsudato da ferida, e o paciente foi diagnosticado com mediastinite causada por *C. striatum*. Um mês antes, um paciente com o mesmo diagnóstico havia falecido nesta mesma unidade hospitalar. As amostras *C. striatum* de ambos os pacientes, possuíam características bioquímicas e genéticas idênticas, desta forma, foi demonstrado que *C. striatum* pode causar infecção potencialmente fatal e que este tipo de infecção pode ser adquirida nosocomialmente. No presente estudo verificou-se uma situação semelhante à pesquisa supracitada, em que as pacientes referentes às amostras 58/68 e 114/306 estiveram internadas lado a lado no CTI, antes da detecção de *C. striatum* em suas hemoculturas. Ambas utilizaram cateteres intravasculares e dispositivos de ventilação mecânica e apresentaram quadro de pneumonia, o que sugere que possa ter ocorrido uma contaminação pessoa-pessoa, veiculada por dispositivos médicos e/ou profissionais de saúde.

A habilidade de produzir biofilme sobre substratos diversos confere aos patógenos a capacidade de permanecer por mais tempo no ambiente e de resistir à ação de agentes químicos e físicos utilizados na rotina de descontaminação e esterilização de materiais, dispositivos e equipamentos de uso hospitalar. Portanto, outro aspecto importante a ser considerado para a caracterização da virulência é a capacidade de formação de biofilme pelas amostras bacterianas. A capacidade de formar biofilmes pode ser um pré-requisito para a patogênese de doenças nosocomiais. Os biofilmes já foram encontrados em inúmeros dispositivos médicos incluindo próteses, cateteres intravasculares e urinários, tubos endotraqueais, sondas endoscópicas, marca-passos e sistemas de hemodiálise. Sua presença pode ter sérias implicações para pacientes imunocomprometidos e pacientes que têm

dispositivos médicos de longa permanência (Rutala *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2010; Donlan, 2011; Souza *et al.*, 2015; Sing *et al.*, 2017).

A capacidade de produção de biofilme foi descrita anteriormente para diversas espécies de corinebactérias incluindo *Corynebacterium diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. ulcerans*, *C. minutissimum*, *C. renale*, e *C. striatum* (Mattos-Guaraldi; Formiga, 1991; Gomes *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2015a; Souza *et al.*, 2015b; Chandran *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2017).

Souza e colaboradores em 2015 investigaram a capacidade de produção de biofilme em superfícies abióticas por amostras MDR e MDS de *C. striatum*, isoladas durante o surto nosocomial de 2009/10 no HUPE. Os resultados mostraram que as cepas dos 4 pulsotipos (PFGE-I, II, III e IV) foram capazes de aderir às superfícies testadas, como a superfície hidrofílica do vidro e às superfícies hidrofóbicas do poliestireno e do cateter de poliuretano. A amostra MDR do pulsotipo I foi a maior produtora de biofilme entre as amostras testadas. Tais aspectos reforçam a expressão de biofilmes e a persistência no ambiente hospitalar ao longo do tempo como propriedades importantes de virulência.

Amostras de *C. striatum* isoladas de pontas de cateter, escarro, secreções de traqueostomia e infecções de feridas recentemente identificadas, na Índia por CHANDRAN *et al.* (2016), mostraram-se multirresistentes aos antimicrobianos de uso clínico e fortemente produtoras de biofilme.

Recentemente, analisando amostras clínicas de *C. striatum* oriundas de surtos ocorridos em hospital universitário, no período de 2009 a 2016, Gusmão (2018) relata que, tanto na superfície de poliestireno, como na superfície de cateter de poliuretano, amostras MDR de *C. striatum* do pulsotipo I, destacaram-se por apresentar os maiores valores de produção de biofilme com densidades ópticas variando entre 0,70 e 0,90 ($DO > 4 \times DO_c$). Similarmente, neste trabalho os valores encontrados para a amostra *C. striatum* HCE-BR58 revelaram-se acima de quatro vezes o valor do controle, contudo, nossa amostra apresentou valores significativamente mais altos, variando entre 3,0 e 4,0, sugerindo maior capacidade de produção de biofilme para esta amostra.

De acordo com os critérios previamente utilizados por Souza e colaboradores (2015), para a avaliação da capacidade de produção de biofilme, a análise da formação de biofilme sobre a superfície hidrofílica do vidro revelou que, apesar das amostras testadas neste trabalho apresentarem o mesmo perfil de aderência ao vidro, a amostra de *C. amycolatum* HCE-BR326 apresentou as maiores contagens de células sésseis viáveis. No presente estudo, a amostra de *C. striatum* HCE-BR58 e as amostras de *C. amycolatum* HCE-BR326, HCE-BR395 e HCE-

BR528 foram avaliadas quanto a produção de biofilme em superfícies abióticas e mostraram-se fortemente (+++) produtoras de biofilme na superfície hidrofóbica do poliestireno. Mesmo caracterizadas como fortemente produtoras de biofilme no poliestireno, os valores das contagens de células sésseis viáveis e a análise estatística desses valores indicaram diferenças e similaridades entre os níveis de produção de biofilme das amostras testadas. A maior quantidade de biofilme formado foi observada para a amostra *C. amycolatum* HCE-BR326, contudo esta amostra revelou as menores contagens de células sésseis viáveis. As maiores contagens de viáveis foram observadas para os biofilmes formados pelas amostras *C. amycolatum* HCE-BR395 e HCE-BR528, revelando que, para estas propriedades, não cabem generalizações, mesmo para amostras de mesma espécie, oriundas de mesma região geográfica, coorte de pacientes e sítio de isolamento.

A análise ultraestrutural da formação de biofilme sobre lamínulas de Thermanox™ (substrato hidrofóbico de polipropileno) revelou que todas as amostras submetidas à MEV apresentaram imagens compatíveis com a formação de biofilme maduro. Foi possível identificar a organização do tapete bacteriano ligado à uma matriz basal, com a formação de *hollow voids* (canais para passagem de água e nutrientes para todas as camadas celulares) e com a produção e o acúmulo do material extracelular. Os resultados obtidos foram consistentes com os apresentados por Ceri (2001); Donlan e Costerton (2002); Gomes *et al.* (2009); Souza *et al.*, (2015) e Gusmão (2018).

Segundo TELANDER *et al.*, 1988, VEENSTRA *et al.*, 1996, VUONG e OTTO (2002), a produção de *slime* é considerada um importante fator de virulência conferindo propriedades adesivas e de resistência aos micro-organismos. Existe uma relação entre resistência aos antibióticos e a produção de *slime*, uma vez que a produção de *slime* está associada com a reduzida sensibilidade aos agentes antimicrobianos. Mudanças na fisiologia bacteriana ocorridas em resposta às interações bactéria-bactéria e das mesmas com o ambiente no interior do biofilme parecem ser suficientes para promover maior adesividade a substratos e resistência a agentes biocidas (Diaz-Mitoma *et al.*, 1987; Arciola *et al.*, 2002; Bernardi *et al.*, 2007). NARTEN e colaboradores (2011) reiteram que a tolerância a antimicrobianos por parte das células sésseis é maior do que aquela observada para células planctônicas (Mah e O'toole, 2001; Hilbi *et al.*, 2011) e demonstraram que a produção de biofilme gera aumento significativo (entre 20 e 75 vezes) da resistência à ciprofloxacina e tobramicina para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* associadas a infecções no trato urinário. A resistência aos antibióticos de bactérias em biofilme contribui para a cronicidade das infecções, tais como

aquelas associadas com dispositivos médicos implantados (Hahn *et al.*, 2016; Chandran *et al.*, 2016).

Diversos autores aventam que a produção de *slime* extracelular é um importante indicador de infecções associadas a implantes tanto em seres humanos (Christensen *et al.*, 1982; Younger *et al.*, 1987; Bernardi *et al.*, 2007) quanto em animais (Turkyilmaz e Eskiözlü, 2006). Micro-organismos produtores de *slime* produzem essa substância extracelular durante seu crescimento sobre superfícies inertes, como biomateriais, facilitando a aderência e a formação do biofilme (Christensen *et al.*, 1982; Pfaller *et al.*, 1988; Costerton *et al.*, 1999; Vuong e Otto, 2002). As bactérias associadas ao biofilme são a principal preocupação no tratamento das infecções relacionadas aos biomateriais devido a sua resistência aos processos rotineiros de desinfecção de materiais e a vários agentes antimicrobianos (Needham e Stempsey, 1984; Nickel *et al.*, 1985; Davenport *et al.*, 1986; Younger *et al.*, 1987; Gottenbos *et al.*, 2002).

GUSMÃO (2018) investigou a natureza polissacarídica dos biofilmes formados por amostras MDR e MDS de *C. striatum*, representantes dos diferentes pulsotipos (I, II, V, VI, VII, VIII, IX e X), isoladas de lavado broncoalveolar, cateteres e de sangue e observou que somente uma amostra MDR não foi produtora de *slime*. Similarmente, neste trabalho observamos que a amostra *C. striatum* HCE-BR58 revelou-se como produtora de *slime* demonstrando a importância de polissacarídeos da camada limosa para o processo de formação de biofilme. As amostras *C. amycolatum* não foram capazes de produzir *slime* nas condições de estudo, incentivando a investigação da relevância de outros polissacarídeos e de componentes de outra natureza química para a formação de biofilme por essas espécies.

STEPANOVIC e colaboradores (2007), avaliando biofilmes formados por cepas de *Staphylococcus* isoladas de próteses cirúrgicas, relatam que a coloração com safranina, azul de Comassie, azul de Alcian, entre outros corantes, pode revelar a participação de componentes de natureza química diversa para a formação do biofilme bacteriano. CRAMTON e colaboradores (2001) ressaltam a importância da investigação da composição e mecanismos de formação de biofilme para a elaboração de estratégias terapêuticas e profiláticas. Assim como observado anteriormente para amostras de *Staphylococcus* isoladas de próteses ortopédicas (Cramton *et al.*, 2001; Stepanovic *et al.*, 2007; Esteban *et al.*, 2010), verificamos a predominância da diversidade de natureza dos componentes da matriz exopolimérica do biofilme, entre as diferentes amostras estudadas. Em nosso trabalho, todas as amostras coradas pela safranina revelaram extensa participação de polissacarídeos aparentemente justapostos às células bacterianas, formando uma estrutura similar ao *slime*,

embora apenas a amostra *C. striatum* HCE-BR58 tenha sido positiva no ensaio de crescimento em ágar vermelho do Congo. Adicionalmente, a análise da participação de proteínas no biofilme formado através da coloração com azul de Comassie, revelou extensa participação de proteínas na composição da matriz extracelular, especialmente nas áreas periféricas. Apenas a amostra *C. amycolatum* HCE-BR326 apresentou discreta participação de proteínas na composição da matriz extracelular. Tais resultados estão em acordo com as propriedades adesivas avaliadas anteriormente, uma vez que as amostras apresentadas demonstraram habilidade de formar biofilme tanto sobre substratos hidrofóbicos quanto hidrofílicos, características classicamente relacionadas, respectivamente, à presença de polissacarídeos e proteínas presentes na superfície bacteriana (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2003; Kwaszewska *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2015a).

Diversos fatores influenciam a fixação inicial às superfícies, como o tipo e as propriedades do material da superfície, carga e microtopografia, características intrínsecas do microorganismo, como a carga, hidrofobicidade, presença de apêndices superficiais como pilinas, fimbrias, flagelos e cápsula, além da capacidade de produzir substâncias exopoliméricas (Harrison *et al.*, 2005, Ceri *et al.*, 2001; Fuente-Núñez *et al.*, 2013). Agentes químicos, como antimicrobianos, enzimas proteolíticas, desoxirribonucleases e micronutrientes podem, de acordo com sua biodisponibilidade, modificar a produção de biofilme, conforme descrito anteriormente para *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, e *Corynebacterium diphtheriae* observado para outros patógenos humanos (Gomes *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2010; Kaplan 2011; Kaplan, 2012a; Kaplan, 2012b ; Narten *et al.*, 2012; Chandran *et al.*, 2016). MOREIRA e colaboradores (2003) relatam que, similarmente a outros patógenos humanos, sob cultivo em privação de ferro, *C. diphtheriae* pode desenvolver estratégias metabólicas alternativas para superar as adversidades ambientais, resultando na modulação de propriedades adesivas com aumento da expressão de carboidratos de superfície. Para *C. diphtheriae* a restrição de ferro implicou na regulação da aderência e produção de *slime* como parte de uma resposta global a condições ambientais limitadas ferro que incluiu a desrepressão de genes para a síntese de citotoxinas e sideróforos e para transporte de complexos Fe (III)-sideróforo. Curiosamente, neste trabalho observamos que a privação de ferro promoveu a redução da formação de biofilme sobre poliestireno para todas as amostras avaliadas, indicando que *C. striatum* e *C. amycolatum* carecem dos mecanismos bioquímicos anteriormente identificados para *C. diphtheriae*.

Acredita-se que diferentes amostras de *C. striatum* possuam outros mecanismos de virulência além da resistência aos agentes antimicrobianos e da produção de biofilme. Cabe

ressaltar que MOTA (2014), observou em seu trabalho que entre as amostras de *C. striatum* investigadas apenas as cepas MDR pertencentes ao pulsotipo I foram relacionadas ao óbito dos pacientes dos quais foram isoladas. Apesar de cepas do pulsotipo II também terem apresentado o fenótipo MDR, os casos de infecções relacionados a elas não evoluíram a óbito dos pacientes.

Em relação aos mecanismos de aderência e invasão bacteriana, para obter sucesso na colonização, patógenos microbianos necessitam aderir às superfícies do hospedeiro e esta é uma etapa crítica no estabelecimento da infecção. Inicialmente, a interação de um micro-organismo com as células hospedeiras ocorre via processos não específicos, tais como interações hidrofóbicas entre moléculas da bactéria, como, por exemplo, os ácidos micólicos, e resíduos de manose, com ácidos graxos e neuramínicos de membrana do hospedeiro, respectivamente. ZAPOROZHETS e colaboradores (2010), analisando a influência de glicosídeo-hidrolases sobre a interação de amostras toxinogênicas de *C. diphtheriae* a células epiteliais bucais humanas, observaram que tais enzimas foram capazes de promover a inibição da aderência, especialmente quando as células foram tratadas previamente com tais enzimas, comprovando a importância dos carboidratos de superfície para esse processo. Além disso, interações eletrostáticas também auxiliam nesse processo. Muitas proteínas de superfície bacteriana e do hospedeiro são eletricamente carregadas, podendo favorecer a atração da bactéria pela célula hospedeira (de Matos e Silva, 2013). A habilidade de invadir e permanecer viável no ambiente intracelular consiste em uma estratégia comum entre os micro-organismos patogênicos para estabelecer um nicho privilegiado no hospedeiro. Muitas espécies bacterianas são internalizadas por células endoteliais, mesmo que as mesmas não sejam consideradas células fagocíticas (Finlay e Falkow, 1997; Pereira, 2007; Stavracakis-Peixoto *et al.*, 2014).

Os mecanismos envolvidos na invasão bacteriana, maturação do fagossoma e disseminação revelam estratégias comuns, como também, táticas únicas desenvolvidas por determinadas espécies para estabelecer o processo infeccioso com sucesso. Bactérias invasivas induzem ativamente sua própria captação por fagocitose em células normalmente não fagocíticas e, em seguida, estabelecem um nicho seguro para sobreviver, se replicar e disseminar, de célula a célula, por meio de um processo de motilidade à base de actina (Cossart e Sansonetti, 2004).

A ocorrência de infecções sistêmicas causadas por *C. diphtheriae* permitiu sugerir que o micro-organismo seria capaz, não apenas de aderir à superfície de células do epitélio respiratório, como também, de invadir e atingir tecidos mais profundos (Mattos-guaraldi e

Formiga, 1998; Hirata *et al.*, 2002; 2004; Bertuccini *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010; Sabbadini *et al.*, 2012; Stavracakis-Peixoto *et al.*, 2014). É provável que o processo de internalização também seja de importância na manutenção do *C. diphtheriae* nas vias aéreas superiores, inferiores e hematogênicas. A manutenção de micro-organismos viáveis no compartimento intracelular poderia também justificar a permanência do estado de portador, após a cura da difteria e antibioticoterapia em associação com a administração do soro antidiftérico (Kadirova *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2010).

A autofagia funciona como uma barreira de imunidade inata contra a infecção, livrando o citosol de micro-organismos através da degradação lisossômica. Os efeitos antibacterianos da autofagia podem estar relacionados tanto com a degradação de patógenos intracelulares como com a degradação das toxinas por eles produzidas. Os patógenos desenvolveram mecanismos de evasão ou subversão da maquinaria autofágica do hospedeiro. Patógenos bacterianos podem evitar a fusão do autofagossoma com os lisossomas para fugir da degradação ou para utilizar os nutrientes nessas vesículas. É necessário entender melhor como as vias de sinalização imunológica se cruzam com a via da autofagia, como as moléculas hospedeiras identificam e direcionam os patógenos intracelulares ao autofagossoma e como os fatores microbianos e do hospedeiro interagem para utilizar a autofagia em benefício de um ou de outro. A resposta a essas perguntas poderão permitir o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças infecciosas (Overdahl e Levine, 2009).

Em relação ao ensaio de interação das amostras bacterianas *C. striatum* HCE-BR58, *C. amycolatum* HCE-BR326 e HCE-BR528 com células epiteliais respiratórias humanas (A549), no que tange aos percentuais de associação, verificou-se que as amostras *C. striatum* HCE-BR58 e *C. amycolatum* HCE-BR528 tiveram um aumento da associação com o passar do tempo, enquanto que a amostra *C. amycolatum* HCE-BR326, por sua vez, apresentou uma dinâmica inversa, com redução dos percentuais de associação com o decorrer do tempo. O fato das amostras de *C. amycolatum* terem se comportado de forma diversa apesar de pertencerem à mesma espécie, pode ser explicado pela variabilidade de elementos de superfície e sensibilidades diferentes frente às substâncias produzidas e à fagocitose pelos pneumócitos (A549).

OTT e colaboradores (2013) analisando os processos de adesão e internalização, de *C. diphtheriae* a células epiteliais humanas D562 e HeLa verificaram que não havia uma correlação aparente entre os percentuais de aderência e invasão e, ainda, que a infecção por

este agente é determinada pela sua internalização, sendo a invasão um processo ativo, fato comprovado pela interrupção da invasão pelo tratamento das bactérias com tetraciclina.

A amostra HCE-BR58 (*C. striatum*) foi a que apresentou a maior afinidade pelo pneumócito A549, esse resultado indica a maior capacidade de associação funcionando como um importante fator de virulência para pneumonia, contudo esta amostra apresentou os menores percentuais de viabilidade intracelular, fato este que sugere que a célula possa estar expressando mediadores capazes de modular a internalização e induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio promovendo a destruição de bactérias internalizadas. Para reforçar essa hipótese, considerou-se o estudo de LIN e colaboradores (2014) que analisaram o papel da Sirtuina 1 (SIRT1) na mediação da expressão de defensina-2 e interleucina-8 por linhagens de células epiteliais alveolares (A549) induzidas por *Streptococcus pneumoniae*, verificando que epitélio alveolar atua como uma barreira efetiva e como participante ativo na defesa do hospedeiro contra a invasão bacteriana, através da produção de vários mediadores.

GOYAL e colaboradores (2015), isolaram amostras de *Haemophilus influenzae* não tipificável (NTHi) de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) que foram capazes de aderir e invadir eficientemente células tipo II de epitélio alveolar (A549). Durante os estágios iniciais, ou seja, 6h após infecção observou-se um aumento substancial na invasão pelo NTHi sem evidência de replicação intracelular. A microscopia eletrônica mostrou que a maioria de NTHi internalizado residia dentro de vacúolos endocíticos ácidos ligados à membrana. Entretanto, em estágios tardios, ou seja, 8h pós infecção, uma redução significativa na viabilidade de NTHi foi observada e foram encontrados vacúolos vazios com escape de NTHi para o citosol. Por 12h, foram evidentes mudanças citopáticas nas células com vacuolização massiva do citoplasma, intensa condensação da cromatina e membrana plasmática intacta. Além disso, a análise de marcadores apoptóticos confirmou que as células A549 infectadas sofreram apoptose em estágios tardios; a inibição da internalização de NTHi pelo uso da citocalasina D evitou a apoptose das células. Esses achados sugerem que a internalização de NTHi e seu escape dos compartimentos vacuolares disparam a citotoxicidade das células alveolares via apoptose durante o processo infeccioso.

Em relação à viabilidade intracelular das amostras HCE-BR326 e HCE-BR528 (*C. amycolatum*), observou-se que as amostras diferem quanto à afinidade e intensidade de sobrevivência no hospedeiro, reiterando os achados de OTT e colaboradores (2013) para *C. diphtheriae*.

Uma vez que o patógeno tenha se estabelecido em um hospedeiro e invadido o ambiente intracelular, sucede-se a persistência e multiplicação intracelular como principal estratégia de virulência. No meio intracelular o patógeno encontra um ambiente livre da ação da maioria dos antimicrobianos e dos componentes celulares e humorais do sistema imune do hospedeiro onde pode permanecer e propagar até que a célula entre em falência sofrendo lise ou apoptose, conforme descrito anteriormente para algumas corinebactérias frente a células epiteliais e endoteliais de linhagem (Odeh e Quinn, 2000; Souza *et al.*, 2015b).

Segundo Souza e colaboradores (2015b), a habilidade de *C. pseudodiphtheriticum* de sobreviver e multiplicar no espaço interno de células epiteliais pode intensificar sua patogenicidade, uma vez que, a utilização do espaço intracelular pode significar a sobrevivência sob condições extracelulares adversas. Alguns micro-organismos, incluindo *C. diphtheriae*, *C. bovis*, *C. pseudotuberculosis*, podem sobreviver aos mecanismos de “clearance” do sistema imunológico, ao permanecerem viáveis na presença de espécies reativas de oxigênio, no interior de vacúolos endocíticos em macrófagos e células epiteliais (Honkanen-Buzalski *et al.* 1984; Santos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2015; Pacheco *et al.*, 2012). Similarmente, neste trabalho, observamos que todas as amostras estudadas foram capazes de persistir após 6 horas de infecção nos tapetes celulares de pneumócitos A549, contudo a amostra *C. striatum* apresentou maiores percentuais de persistência, em menores intervalos de tempo, sugerindo maior adaptabilidade ao meio interno celular. A persistência das amostras *C. amycolatum* foi mais tardia, iniciando-se a partir de 6 horas de incubação, contudo efeitos deletérios mais evidentes foram observados sobre os tapetes celulares.

A habilidade de aderir a substratos abióticos de naturezas químicas diversas, mesmo sob condições de privação de microelementos (ferro) e formar biofilme sobre estas, bem como, de se associar, invadir e persistir no interior de células eucarióticas de linhagem, refletiu o potencial patogênico das amostras estudadas estimulando a investigação *in vivo* do processo de interação bacteriana e de seu potencial citopático e letal.

Estudos anteriores (Santos *et al.*, 2015; Antunes *et al.*, 2016) mostraram que corinebactérias são capazes de colonizar *C. elegans* e provocar tanto mudanças morfológicas como comportamentais, e para estudar os efeitos deletérios dessa colonização, foi aferida a sobrevivência dos nematódeos em relação ao contato com as bactérias. Foi observada uma influência significativa da amostra *C. glutamicum* ATCC13032, enquanto que as amostras *C. diphtheriae* CDC-E8392, *C. ulcerans* 809 e BR-AD22 prejudicaram dramaticamente a sobrevivência do helminto. Após 5 dias de infecção, aproximadamente 70% de mortalidade

foi observada para os nematódeos infectados por *C. diphtheriae* e aproximadamente 90% no caso das duas amostras de *C. ulcerans*.

No presente estudo, ensaios de sobrevivência dos nematódeos indicaram que as amostras de *C. amycolatum* HCE-BR326 e HCE-BR528 expressaram um elevado potencial de citopatogenicidade e de letalidade precoce com morte de 100% dos nematódeos em apenas 24h, sugerindo que sejam mais virulentas para os vermes do que as amostras *C. amycolatum* HCE-BR395 e *C. striatum* HCE-BR58 que após 5 dias de infecção mataram 90% e 73% dos helmintos, respectivamente, revelando percentuais ainda mais elevados que os descritos anteriormente para *C. ulcerans* indicando que as amostras estudadas apresentam elevado potencial de patogenicidade. A alta velocidade de indução de morte nos helmintos sugere a existência de fatores de virulência pré-existentes como toxinas, antígenos de superfície e outros agentes pró-inflamatórios que atuam rapidamente promovendo a morte celular e destruição tecidual, similarmente ao descrito anteriormente para *C. diphtheriae* (toxina diftérica, DIP0733, proteínas fimbriais Spa), *C. ulcerans* (toxina diftérica, toxina shiga-like, fosfolipase) e *C. pseudotuberculosis* (toxina diftérica, fosfolipase) (Trost *et al.*, 2011; Broadway *et al.*, 2013; Antunes *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015).

A infecção em modelo experimental murino reafirmou o potencial patogênico das amostras testadas, quando observamos o aumento da leucometria global, com neutrofilia, linfocitose e monocitose absolutas especialmente para as amostras *C. amycolatum* HCE-BR326 e *C. striatum* HCE-BR58 (100% dos animais apresentaram leucocitose em resposta a infecção), ambas consideradas letais para *C. elegans* e que demonstraram a habilidade de aderir aos diferentes substratos testados, incluindo vidro, poliestireno e células eucarióticas, bem como produzir biofilme nestas superfícies mesmo na ausência de ferro. Estudos adicionais são necessários para determinar os mecanismos que promovem as alterações observadas nos modelos experimentais *in vivo*.

A identificação de atributos de virulência além da produção de biofilme e a multirresistência a agentes antimicrobianos, como a habilidade de se ligar a substratos diversos e produzir biofilmes, bem como persistir no interior de células do hospedeiro e promover mecanismos de morte celular, aliada ao entendimento da contribuição da integração destes atributos para a patogenicidade de *C. striatum* e *C. amycolatum* podem subsidiar o desenvolvimento de estratégias para a prevenção, monitoramento e o controle das infecções por este agente. Diante deste panorama, estudos adicionais acerca desses e de outros atributos de virulência e da sua relevância para a patogenia de corinebactérias permanecem necessários,

na tentativa de minimizar o envolvimento destes patógenos como agentes etiológicos de IRAS.

Os resultados apontam para *C. striatum* e *C. amycolatum* como patógenos nosocomiais oportunistas prevalentes em pacientes hospitalizados, principalmente em unidades fechadas, portadores de comorbidades e submetidos a tratamentos e intervenções invasivas, que favorecem o comprometimento da imunidade. Esses patógenos podem estar envolvidos em surtos nosocomiais, com disseminação de clones resistentes a antimicrobianos, apresentando propriedades adesivas que colaboram para sua persistência no ambiente e para sua disseminação através de dispositivos médicos invasivos e/ou da colonização de profissionais de assistência à saúde.

Profissionais de saúde das diferentes especialidades devem investir esforços colaborando em ações multidisciplinares no sentido de prevenir, monitorar, controlar e elaborar novas estratégias terapêuticas no intuito de combater as corinebacterioses nos ambientes de assistência à saúde.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento das atividades, relativas a este trabalho de tese, permitiram o delineamento das conclusões apresentadas a seguir:

Os resultados apontam para *C. striatum* e *C. amycolatum* como patógenos nosocomiais oportunistas prevalentes em pacientes hospitalizados, principalmente em unidades fechadas, portadores de comorbidades e submetidos a tratamentos e intervenções invasivas, que favorecem o comprometimento da imunidade, sendo as principais espécies de bacilos Gram positivos envolvidas nas bacteremias em pacientes em terapia intensiva nas condições de estudo.

A utilização do MALDI-TOF neste trabalho permitiu, com elevada eficiência, a identificação de bacilos Gram-positivos, incluindo espécies dos gêneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Brevibacterium*, *Listeria* e *Tsukamurella* oferecendo uma importante alternativa para o diagnóstico clínico-laboratorial das corinebacterioses com precisão e agilidade.

O isolamento através do uso de meio de cultura seletivo (Ágar Chocolate Telurito) e a incubação por tempo mínimo de 48h são fundamentais para a identificação das amostras de corinebactérias.

A resistência emergente encontrada em *C. striatum* e *C. amycolatum* alerta para o fato de que estas espécies podem propagar a resistência a outros micro-organismos e constituir um grave problema de saúde pública, especialmente quando nos ambientes de assistência à saúde.

O perfil de resistência apresentado pelas amostras de *C. striatum* estudadas, pertencentes ao pulsotipo IC, foi idêntico ao perfil observado para as amostras pertencentes ao pulsotipo I isoladas de pacientes de outro Hospital da região metropolitana do Rio de Janeiro indicando a possibilidade de circulação e/ou troca entre as unidades de assistência a saúde. Adicionalmente, a detecção da resistência à daptomicina, entre as amostras estudadas, é motivo de preocupação para os profissionais da saúde, uma vez que já foi comprovado que a exposição de *C. striatum* a esta droga é acompanhada do aumento da resistência à vancomicina.

Todas as amostras estudadas foram capazes de aderir e formar biofilme sobre todas as superfícies testadas, revelando a versatilidade dessas corinebactérias e a contribuição destas habilidades para sua persistência nos ambientes de assistência a saúde, seja sobre dispositivos médicos, seja sobre equipamentos e superfícies. Adicionalmente, a produção de um biofilme maduro, com composição química diversificada vem complementar tais habilidades

oferecendo uma eficiente barreira físico-química à ação de antimicrobianos e agentes biocidas rotineiramente utilizados nos ambientes hospitalares para descontaminação e esterilização de materiais o que indica a necessidade de revisão dessas metodologias.

Atributos de virulência revelados através de ensaios de interação *in vivo*, incluindo a habilidade de se ligar e persistir no interior de células do hospedeiro, promover mecanismos de morte celular, patogenicidade e letalidade para *C. elegans* e alterações hematológicas em camundongos, reiteram a relevância de *C. striatum* e *C. amycolatum* como patógenos emergentes nos ambientes de assistência à saúde, de modo que, a realização de ações multidisciplinares no sentido de prevenir, monitorar, controlar e de elaborar novas estratégias terapêuticas, no intuito de combater as corinebacterioses nos ambientes de assistência à saúde, deve ser incentivada pelos seus gestores através de políticas de controle de infecções e preservação da saúde.

REFERÊNCIAS

ADDERSON, E. E.; BOUDREAUX, J. W.; HAYDEN, R.T. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. **Ped. Infect. Dis J**, n.27, p136-41, 2008.

AHMED KK, KAWAKAMI K, WATANABE H, MITSUSHIMA T, NAGATAKE, MATSUMOTO K. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. **Clin. Infect. Dis**, n.20, p41-46, 1995.

AJMAL S, SALEH OA, BEAM E. 2017. Development of high-grade daptomycin resistance in a patient being treated for *Corynebacterium striatum* infection. **Antimicrob Agents Chemother**, n.61, p705-17, 2017.

ALATOOM AA, CAZANAVE CJ, CUNNINGHAM SA, IHDE SM, PATEL R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, n.50, p160-163, 2012.

ALIBI S, FERJANI A, BOUKADIDA J, ET AL. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. **Scientific Reports**, n.7, p9704, 2017.

ALLEGIANZI B, BAGHERI NEJAD S, COMBESCURE C, GRAAFMANS W, ATTAR H, DONALDSON L, PITTER D. Burden of endemic health-care associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, n.377, p228-41, 2011.

ALLISON, D.G. The biofilm matrix. **Biofouling**, n.19, p139-150, 2003.

ALMUZARA MN, MIER DEC, RODRIGUEZ CR, FAMIGLIETTIAMR, VAY CA. Evaluacion del sistema API Coryne, version 2.0, para la identificacion de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clinica. **Revista Argentina de Microbiologia**, n.38, p197-201, 2006.

ALTEMEIER A, BURKE JF, PRUITT BA, SANDUSKY WR. Definitions and classifications of surgical infections. In: Altemeier WA, ed. **Manual on Control of Infection in Surgical Patients**, Vol. 1. Philadelphia, PA: JB Lippincott; p19-30, 1993.

ANTUNES, C.A., CLARK, L., WANUSKE, M.T., HACKER, E., OTT, L., SIMPSON-LOUREDO, L., LUNA, M.G., HIRATA, JR. R., MATTOS-GUARALDI, A.L., HODGKIN, J., E BURKOVSKI, A. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria. **Microbiology**, n.162, p84-93, 2015b.

ANTUNES, C.A., SANTOS, L.S., HACKER, E., KÖHLER, S., BÖSL, K., OTT, L., DE LUNA, MD., HIRATA, R.JR., AZEVEDO, V.A., MATTOS-GUARALDI, A.L., E BURKOVSKI, A Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, n.161, p639-647, 2015a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde. **Revista de Saúde Pública**, Brasil, v. 38, n. 3, jun. 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Controle de Infecção em Serviços da Saúde. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/legis.htm>>. Acesso em 04 jan. 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar. In: Caderno C Métodos de Proteção Anti-infecciosa. Brasil, 2000. 84 p. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf>>. Acesso em 04 jan. 2014.

ARCIOLA CR, CAMPOCCIA D, MONTANARO L. Detection of biofilm forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **Expert Rev Mol Diagn**, n.2, p478-84, 2002.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. Infecção relacionada ao uso de cateteres vasculares. São Paulo (SP). Disponível em: www.apecih.org.br/informe-tecnico/125. Acesso em: 15 out 2008.

BAIO, P.V., MOTA, H.F., FREITAS, A. D., GOMES, D.L., RAMOS, J.N., SANTANNA, L., SOUZA, M.C., CAMELLO, T.C.F., HIRATA JR R., VIEIRA, V.V., MATTOS-GUARALDI, A.L. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.108, n.1, p23-29, 2013.

BALLA, K. M. E TROEMEL, E. R. *Caenorhabditis elegans* as a model for intracellular pathogen infection. **Cellular microbiology**, n.15, p1313-1322, 2013.

BARBERIS C, ALMUZARA M, JOIN-LAMBERT O, RAMÍREZ MS, FAMIGLIETTI A, ET AL. Comparison of the Bruker MALDI-TOF Mass Spectrometry System and Conventional Phenotypic Methods for Identification of Gram-Positive Rods. **PLoS ONE** v.9, n.9, 2014.

BARON, E.J.; PETERSON L. R.; FINEGOLD, S.M. Methods for testing antimicrobial effectiveness In: **Bailey and Scott's diagnostic microbiology**, 9th ed. St. Louis- Mosby - year. book, ink.; 70, p168-193, 1994.

BARREAU C, BIMET F, KIREDJIAN M, ROUILLON N, BIZET C 1993. Comparative chemotaxonomic studies of mycolic acid-free coryneform bacteria of human origin. **J Clin Microbiol**, n.31, p2085-2090, 1993

BAUER W, KIRBY W M, SHEERRIS JC, TURCCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Americ J Clin Pat**, n.45, p493-496, 1996.

BAUMGARTNER JN, COOPER SL. Influence of thrombus components in mediating *Staphylococcus aureus* adhesion to polyurethane surfaces. **J Biomed Mater Res**, n.40, p660-70, 1998.

BELMARES J. *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. **BMC Infectious Diseases**, v.7, n.2, p1-8, 2007

BELTRÁN-ARROYAVE CLAUDIA, DÍAZ-DÍAZ ALEJANDRO, LOAIZA-DÍAZ NATALIA. Chronic osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum* in a female adolescent. **Rev. Chil. Infectol**, v.33, n.6, p 696-699, 2016.

BENCHIMOL, M. Localização de cálcio. In de Souza, W. (ed.) **Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. RJ Brasil.p80-83, 1998.

BENET T, VANHEMS P. Correlation of nosocomial bloodstream infection incidences: an ecological study. **J Hosp Infect**, n.73, p217-24, 2009.

BERNARD, K. the genus *Corynebacterium* and other medically relevant Coryneform-like bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.10, p3152-3158, 2012.

BERNARDI AC, PIZZOLITTO EL, PIZZOLITTO AC. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.57-66, 2007.

BERNER R, PELZ K, WILHELM C, FUNKE A, LEITITIS JU, BRANDIS M. Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. **J Clin Microbiol**, n.35, p1011-1012, 1997.

BERTUCCINI, L., BALDASSARRI, L., E VON HUNOLSTEIN, C. Internalization of non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. **Microb Pathog**, n.37, p111-118, 2004.

BIBERSTEIN, E. L.; ZEE, Y. C. **Tratado de Microbiologia Veterinaria**. Zaragoza: Acriba.; 157-161,1994.

BISHAI WR, MURPHY JR. Difteria e outras infecções causadas por corinebactérias e espécies relacionadas. In: **Doenças infecciosas de Harrison**. 2ed. AMGH. 1120p.

BISWAL L, DAWAR R, DEB M, GAIND R, MOHAPATRA S. *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial pathogen in a case of laryngeal carcinoma. **Indian J Med Microbiol**, v.32, n.3, p323-24, 2014.

BOLTIN, D.ET AL.*Corynebacterium striatum*, A classic pathogen eluding diagnosis. Recent capital inflows to developing countries. **Wor.Ban. Econ. Rev**, n.10, p27–50, 2009.

BONMARIN I, GUIZO N, LE FLÈCHE-MATÉOS A, PATEY O, PATRICK AD, LEVY-BRUHL D. Diphtheria: a zoonotic disease in France? **Vaccine**, v.27, n.31, p4196-4200, 2009.

BONO M, BARGMANN C. Natural Variation in a Neuropeptide Y Receptor Homolog Modifies Social Behavior and Food Response in *C. elegans*. **Cell**, v. 94, n.5, p679-689, 1998.

BONVENTO M. acessos Vasculares e Infecção Relacionada à Cateter. **Rev Bras Terap Int**. v.19, n.2, 2007.

BRANDENBURG AHA, VAN BELKUM C, VAN PELT HA, BRUINING JW, MOUTON HA, VERBRUG H. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. **J. Clin. Microb**, n.34, p2089–2094, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Unidade I: Epidemiologia aplicada ao controle das infecções hospitalares. P4. I Curso de Prevenção e Controle de Infecções Hospitalares, 1998.

BROADWAY, M.M., ROGERS, E.A., CHANG, C., HUANG, I.H., DWIVEDI, P., YILDIRIM, S., SCHMITT, M. P., DAS, A. E TON-THAT, H. (2013). Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. **Journal of bacteriology**, n.195, p3774-3783, 2013.

BROOKS, GEO. F. ET AL. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BROWN A.E., Others Corynebacteria and *Rhodococcus*. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. New York: Churchill-Livingstone, 2000.

BROWNING, DF, WELLS, TJ., FRANÇA, FL, MORRIS, FC, SEVASTSYANOVICH, YR, BRYANT, JA, JOHNSON, MD, LUND, PA, CUNNINGHAM, AF, ET.AL. Laboratory adapted *Escherichia coli* K-12 becomes a pathogen of *Caenorhabditis elegans* upon restoration of O antigen biosynthesis. **Mol Microbiol**, n.87, p939–950, 2013.

BRUN-BRUISSON, C.; ET AL. Estrutura de biofilme. **Bol. de Biotec**, 2005.

BURKE GJ, MALOUF MA, GLANVILLE AR. Opportunistic lung infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* after lung and heart transplantation. **Med J Aust** n.166, p362-364, 1997.

BURKOVSKI A. Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. **ISRN Microbiology**, 2013.

CAMELLO, T.C.F., MATTOS-GUARALDI, A.L., FORMIGA, L.C.D. AND MARQUES, E.A. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian J Microbiol**, n.34, p39-44, 2003.

CAMELLO, T.C.F., SOUZA, M.C., MARTINS, C.A.S., DAMASCO, P.V., MARQUES, E.A., PIMENTA, F.P., PEREIRA, G.A., HIRATA JR R., MATTOS-GUARALDI, A.L. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. **Applied Microbiology**, n.48, p458-464, 2008.

CAMPANILE F, CARRETTO E, BARBARINI D, GRIGIS A, FALCONE M, GOGGIO A, VENDITTI,M, STEFANI S. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains. **Emerg Infec Dis**, n.15, p75-78, 2009.

CARRARA D. Fisiopatogenia das infecções associadas a cateter intravascular – o papel do biofilme. In: **Infecção da corrente sanguínea associada ao uso de cateteres vasculares**. 4 ed. São Paulo:APECH, 2016.

CDC - Centers for Disease Control. National Nosocomial Infection Study Report. Atlanta: Centers for Disease Control, 1979.

CERI H, OSLAN M, MORK D, STOREY D, READ R, BURET A, OSLAN B. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocid susceptibility tenting. **Methods in Enzymology**, n.337, p377-385, 2001.

CHANDRAN R, PUTHUKKICAL DR, SUMAN E, MANGALORE SK. Diphtheroids- Important Nosocomial Pathogens. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.10, n.12, p28-31, 2016.

CHAMBARD M, GABRION J, MAUCHAMP J. Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. **J Cell Biol**, n.91, p157-166, 1981.

CHATZOPOULOU M, KOUFAKIS T, VOULGARIDI I, GABRANIS I, TSIAKALOU M.
A case of fatal sepsis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*. **Hippokratia**,
v.20, n1, p67-69, 2016.

CHEN, F., HSUEH, P., TENG, S., TSONG, Y.O. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. **Journal of microbiology, Immunology and Infection**, n.45, p255-258, 2012.

CHIN, H. J.; JAMES, T. D. Control of Communicable Disease Manual. **Amer.Pub. H. Assoc.**, Washington .D.C., 2000.

CHIU YL, WU VC, WUN KD, HSUEH PR. Recurrent peritonitis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Clin Nephrol**, n.63, p241-242, 2005.

CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, BISNO AL, BEACHEY EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infect Immun**, n.37, p318-26, 1982.

CHUNG, C.S. ET AL. Percutaneous nephrostomy tube-associated bacteremia caused by *Corynebacterium urealyticum*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 41, p525-527, 2008.

CLARKE R, QAMRUDDIN A, TAYLOR M, PANIGRAHI H. Septic arthritis caused by *Corynebacterium amycolatum* following vascular graft sepsis. **J Infect**, n.38, p126-127, 1999

CLARRIDGE JE., AND SPIEGEL CA., *Corynebacterium* and Miscellaneous Irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*. In Murray P.R. Ed in Chief, Barron E.L., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. Eds. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 1995.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI document M45-2A.) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. CLSI, Wayne, PA; 2015

COLLINS MD, BURTON RA, JONES D. *Corynebacterium amycolatum* sp. nov., a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. **FEMS Microbiol Lett** n.49, p349-52, 1988.

COLLINS, M. O., CUMMINS, C. S. Genus *Corynebacterium*. In **Berg Manual of Systematic Bacteriology**. vol. 2, pp. 1266-1276 Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

COSSART, P. E SANSONETTI, P.J. Bacterial invasin: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, n.304, p242-248, 2004.

COSTERTON J.W. Overview of microbial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology** n.15, p137-140, 1995.

COSTERTON JW, STEWART P, GREENBERG E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, n.284, p1318-1322, 1999.

COSTERTON JW, VEEH R, SHIRTLIFF M. The application of biofilm science to the study of and control of chronic bacterial infections. **J Clin Inv**, n.112, p1446-1477, 2003.

COYLE MB, LIPSKY BA. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. **Clin Microbiol Rev**, v.3, n.3, p227-246, 1990.

CRAMTON SE, GERKEC, GOTZ F. *In vitro* methods to study staphylococcal biofilm formation. **Methods Enzymol**, n.336, p239-55, 2001.

DAISUKE U, OISHI T, YAMANE K, TERADA K. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with a catheter-related blood stream infection. **Hindawi. Case Report in Infectious Diseases**, p1-3, 2017.

DALAL A, URBAN C, SEGAL-MAURER S. Endocarditis due to *Corynebacterium amycolatum*. **Journal of Medical Microbiology**, n.57, p1299-1302, 2008

DANIELS C, SCHOORS D, VAN CAMP G. Native valve endocarditis with aorta-to-left atrial fistula due to *Corynebacterium amycolatum*. **Eur J Echocardiogr.**, n.4, p68-70, 2003.

DAVENPORT DS, MASSANARI RM, PFALLER MA, BALE MJ, STREED SA, HIERHOLZER WJ. Usefulness of a test for *slime* production as a marker for clinically significant infections with coagulase negative staphylococci. **J Infect Dis.**, n.153, p332-339, 1986.

DE MATOS E SILVA, CA. Interação de *Mycobacterium leprae* com células epiteliais humanas das vias aéreas: aderência, entrada, sobrevivência e identificação das potenciais adesinas através da análise do proteoma de superfície. 191f. Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2013.

DE MIGUEL I, RODRIGUEZ E, MARTIN AM. 1999. *Corynebacterium amycolatum*: sepsis in hematologic patients. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, n.17, p340-341, 1999.

DIAS AASO, SILVA JR FC, PEREIRA GA, SOUZA MC, CAMELLO TCF, DAMASCENO JALD, ET AL. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.10, n.8, p743-748, 2010.

DIAZ-MITOMA FG, HARDING GKM, HOBAN DJ, ROBERTS RS, LOW DE. Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunts infections with coagulase negative staphylococci. **J Inf Dis**, n.156, p555-560, 1987.

DIEZ-AGUILAR M, RUIZ-GARBAJOSA P, FERNANDEZ-OLMOS A, ET AL. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, n.32, p769–772, 2013.

DITTMANN S. Epidemic diphtheria in the newly independent states of the former USSR-situation and lessons learned. **Biologicals.**, n.25, p179-186, 1997.

DONLAN, RM. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, n.7, v.2, p277-281, 2001.

DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.**, n.15, p167–193, 2002.

DONLAN RM. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. **Clin Infect Dis.**, n.52,v.8, p1038-1045, 2011.

DONOWITZ GR, MAKI DG, CORNICH CJ, PAPPAS PG, ROLSTON PVI. Infection in the neutropenic patient – new views of an old problem. In: Hematology 2001. **American Society of Hematology**, p113-139, 2001.

DOOLEY, M.P.; FERNANDEZ-ARIAS, E.; KLETZER, K. Is the debt crisis history? Diagnosis Of Central Venous Catheter-Related Sepsis: Critical Level Of Quantitative Tip Cultures, **Arch. Intern. Med.**, n.147, p873-877, 1996.

DORNER U, SCHIFFLER B, LANÉELLE MA, DAFFÉ M, BENZ R. Identification of a cell-wall channel in the corynemycolic acid-free Gram-positive bacterium *Corynebacterium amycolatum*. **International Microbiology**, n.12, v.1, p29-38, 2009.

EIKMANNS, B. J., AND BLOMBACH, B. The pyruvate dehydrogenase complex of *Corynebacterium glutamicum*: an attractive target for metabolic engineering. **J. Biotechnol.** N.192, p339–345, 2014.

ELASRI, M.O.; MILLER, R.V. Study of the response of the biofilm bacterial community to UV radiation. **Appl. and Environ. Microb.**, n.65, p2025-2031, 1999.

ELTING LS, RUBENSTEIN EB, ROLSTON KVI, BODEY GP(1997). Outcomes of bacteremia in patients with cancer and neutropenia: observations from two decades of epidemiological and clinical trials. **Clin Infect Dis.**, n25, p247-259, 1997.

ESTEBAN J, NIETO E, CALVO R, FERNANDEZ-ROBALS R, VALERO-GUILLEN PL, SORIANO F. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n.18, p518-521, 1999.

ESTEBAN J, MOLINA-MANSO D, SPILIOPOULOU I, CORDERO-AMPUERO J, FERNÁNDEZ-ROBLAS R, FOKA A, GÓMEZ-BARRENA E. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. **Acta Orthop.** n.81, v.6, p674-679, 2010.

EUZÉBY JP. List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN).;1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 12 dez. 2014.

FERNÁNDEZ GUERRERO ML, ROBLES I, NOGALES MC, NUEVO D. *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial drug-resistant endocardial pathogen. **J Heart Valve Dis.** n.22, p428–430, 2013.

FERNÁNDEZ-AYALA M, NAN DN, FARIÑAS MC. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. **Am J Med.**, n.111, 2001.

FERNANDEZ-ROBLAS, R., ADAMES, H., MARTÍN-DE-HIJAS, N. Z., GARCÍA ALMEIDA, D., GADEA, I., AND ESTEBAN, J. In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, n.33, p453–455, 2009.

FERRAZ EM., BACELAR TS., AGUIAR JL., FERRAZ AA., PAGNOSSIN G., BATISTA JE. Wound infection rates in clean surgery: a potentially misleading risk classification. **Infect Control Hosp Epidemiol**, n.13, v.8, p455-456, 1992.

FINLAY, B.B. E FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, n.61, p136-169, 1997.

FLEMMING, H.C. Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures. **Appl Microbiol Biotechnol**, n.59, p629–640, 2002.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, p872-874, 1989.

FUENTE-NÚÑES C, REFFUVEILLE F, FERNÁNDEZ L, HANCOCK RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**.v.16, p580-589, 2013.

FUNKE G, BERNARD KA. Coryneform gram-positive rods. In: PR Murray, EJ Barron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenen, **Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed., ASM Press Washington DC, p472-501, 2003

FUNKE G AND K A BERNARD. Coryneform Gram-positive rods. In: **Manual of Clinical Microbiology** 10th Ed. (eds.) J Versalovic, K C Carroll, G Funke, J H Jorgensen, M L Landry and D W Warnock. ASM press Washington DC, n.1, p4123-442, 2011.

FUNKE G, LAWSON PA, BERNARD KA, COLLINS MD. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. **J Clin Microbiol** n.34, p1124-1128, 1996.

FUNKE, G. GRAEVENTZ, A., CLARRIDGE, J., BERNARD, K. A. Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, n.10, v.1, p125, 1997.

GAILLOT O, BLONDIAUX N, LOIEZ C, WALLET F, LEMAITRE N, ET AL. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identifications. **J. Clin. Microbiol**, n.19, p4412, 2011.

GARNER IS., IARVIS WR., EMERI TG., HORAN TC., HUGHES IM. CDC definitions for nosocomial infections. **Am J Infect Contr**.n. 16, p128-140, 1988.

GOLDSTEIN EJ, CITRON DM, MERRIAM CV, WARREN YA, TYRREL KL, FERNANDEZ. *In Vitro* Activities of the New Semisynthetic Glycopeptide Telavancin (TD-6424), Vancomycin, Daptomycin, Linezolid, and Four Comparator Agents against Anaerobic Gram-Positive Species and *Corynebacterium* spp. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.48, n.6, p2149-2152, 2004.

GOMES D.L.R.; MARTINS C.A.S.; SANTOS L.S. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy cateter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. **J. Med. Microb**, n.58, p1419-1427, 2009

GOMILA M, RENOM F, GALLEGOS MC, GARAU M, GUERRERO D, SORIANO JB, LALUCAT J. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. **BMC Microbiology**, p12-52, 2012.

GOMINET M, COMPAIN F, BELOIN C, LEBEAUX D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? **APMIS**, n.125, v.4, p365-375, 2017.

GONZALEZ-BARCA E, FERNANDEZ-SEVILLA A, CARRATALA J, GUDIOL F. Prospective study of 288 episodes of bacteremia in neutropenic cancer patients in a single institution. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n.15, p291-296, 1996.

GOYAL M, SINGH M, RAY P, SRINIVASAN R, CHAKRABORTI A. Cellular interaction of nontypeable *Haemophilus influenza* triggers cytotoxicity of infected type II alveolar cells via apoptosis. **FEMS Pathogens and Diseases**, 73, 2015.

GOTTENBOS B, BUSSCHER HJ, VAN DER MEI HC. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **J Mater Sc: Mater Med**, n.13, p717-722, 2002.

GRANOK AB, BENJAMIN P, GARRET LS. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia in an immunocompetent host with cellulitis. **Clinical Infectious Diseases**, n.35, p40-2, 2002.

GUSMÃO LNM. Monitoramento de *Corynebacterium striatum* em hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro: aspectos epidemiológicos, microbiológicos e do potencial de virulência. Dissertação de Mestrado. 2018. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

HAHN WO, WERTH BJ, BUTLER-WU SM, RAKITA R.M. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* associated with increased use of parenteral antimicrobial drugs. **Emerging Infectious Diseases**, n.22, v.11, 2016.

HALKER E, WEY SB, Infecção Hospitalar da Corrente Sanguínea. In: Veronesi R., Focaccia R. Eds. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997.

- HARRISON JJ, TURNER RJ, CERI H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environ Microbiol.**, n.7, v.7, p981-994, 2005.
- HEIDEMANN DG, DUNN SP, DISKIN JA, AIKEN TB. *Corynebacterium striatum* keratitis. **Cornea**, n.10, p81-82, 1991.
- HEDRICK TL, ADAMS JD, SAWYER RG. Implant-Associated Infections: An Overview. J Long-Term Effects. **Med Implants**, n.16, v.1, p83-99, 2006.
- HEMSELEY, C. ABRAHAM, S. ROWLAND-JONES, S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* – A Skin Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, n.29, p938-939, 1999.
- HERMANN M, VADAUX PE, PITTIT D. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as a mediator of adherence of clinical staphylococci isolates to foreign material. **J Infect Dis.** n.158, p693-701, 1988.
- HILBI H, HOFFMANN C, HARRISON CF. *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. **Environ Microbiol Rep**, n.3, v.3, p286-296, 2011.
- HIRATA JR R, NAPOLEÃO F, MONTEIRO-LEAL LH, ANDRADE AF, NAGAO PE, FORMIGA LC, FONSECA LS, MATTOS-GUARALDI AL. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. **FEMS Microbiol Lett**, n.215, p115-119, 2002.
- HIRATA JR R, SOUZA SMS, ROCHA-DE-SOUZA CM, ANDRADE AFB, MONTEIRO-LEAL LH, FORMIGA LCD, MATTOS-GUARALDI AL. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Microb Pathog**, n.36, p125-130, 2004.
- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A. & STALEY J.T. Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. (Eds), **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Williams and Wilkins, Baltimore. 593p, 1994.
- HONKANEN-BUZALSKI T, GRIFFIN TK, DODD FH. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland. **J Dairy Res**, n.51, p371-378, 1984.
- HOWIE, R.; ALFA, M. J.; COOMBS, K. Survive of enveloped and non-enveloped viruses on surfaces compared with other micro-organisms and impact suboptimal disinfectant exposure. **J. Hosp. Infect**, n.69, p368-376, 2008.
- HOYLE B, COSTERTON J. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Prog Drug Res**, n.37, p91-105, 1991.
- HUGHES WT., FLYNN PM., WILLIAMS BG. Nosocomial Infection in Patients with Neoplastic Diseases. In Mayall CG Ed. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1996.
- HUSKINS WC., O'ROURKE EJ., RHINEHART E., GOLDMANN DA. Infection Control in Countries with Limited Resources. In Mayall CG Ed. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1996.

IARIA C, STASSI G, COSTA GB, ET AL. Outbreak of multi-resistant *Corynebacterium striatum* infection in an Italian general intensive care unit. **J Hosp Infect.**;67:102-104, 2007.

INDRIGO J, HUNTER JR, ACTOR JK. Cord factor trehalose 6,6-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. **Microbiology**, v.149, no.8, p2049–2059, 2003.

INFANTIDOU, A.M., DIAMANTIDIS, M.D., TSELIKI, G.,ANGELOU, A.S., CHRISTIDOU, P., PAPA, A., PENTILAS, D. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in a hemodialyzed patient. **International Journal of Infectious Diseases**, n.14, p265-268, 2010.

JANDA WM. *Corynebacterium* species and the Coryneform Bacteria: Part I: New and Emerging Species in the Genus *Corynebacterium*. **Clin Microb**, Newles, USA. n.20, p41-52, 1998.

KADIROVA, R., KARTOGLU, H.Ü., E STREBEL, P.M. Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, **J Infect Dis**, n.181, p 110-115, 2000.

KALLET, T., E HENGARTNER, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat. Rev. Drug Discovery**, n.5, p387-398, 2006.

KAPLAN JB. Antibiotic-induced biofilm formation. **Int J Artif Organs**, n.34, v. 9, p737-51, 2011.

KAPLAN JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **J Dent Res**, n.89, v.3, p205-218, 2010.

KAPLAN JB, IZANO EA, GOPAL P, KARWACKI MT, KIM S, BOSE JL, BAYLES KW, HORSWILL AR. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **MBio**, n.31, v.3(4) p198-12, 2012b.

KAPLAN JB, LOVETRI K, CARDONA ST, MADHYASTHA S, SADOVSKAYA I, JABBOURI S, IZANO EA. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. **J Antibiot (Tokyo)**, n.65, v.2, p73-77, 2012a.

KATSIKOIANNI M, MISSIRLIS YF. Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and Techniques used in Estimating Bacteria - Material Interactions. **Eur Cells Mat**, n.8, p37-57, 2004.

KHAMIS A R., RAOULT D, LA SCOLA B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, n.42, v.9, p3925-3931, 2004.

KNOX, K. L.; HOLMES, A. H. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other Nondiphtheriae *Corynebacteria*. **Emerg.Infec. Dis.**, London.; n.8, p97-99, 2000.

KOH A, PIZZO PA. Empirical oral antibiotic therapy for low risk febrile cancer patients with neutropenia. **Cancer Invest**, n.20, v.3, p420-433, 2002.

KOLL BS, BROWN AE, The changing epidemiology of infections at cancer hospitals. **Clin Infect Dis**, suppl 2:S322-8, 1993.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KONRAD R, BERGER A, HUBER I, BOSCHERT V, HÖRMANSDORFER S, BUSCH U, HOGARDT M, SCHUBERT S, SING A. 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, 2010.

KWASZEWSKA AK, BREWCZYNSKA A, SZEWCZYK EM. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. **Pol J. Microbiol**, n.55, p189-93, 2006.

LAGROU K, VERHAEGEN J, JANSSENS M, WAUTERS G, VERBIST L. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance and antibiotic susceptibility. **Diag. Microbiol. Infect. Dis**, n.30, p7-15, 1998.

LAWRENCE JR, KORBER DR, HOYLE BD, COSTERTON JW. Optical Sectioning of Microbial Biofilm. **J Bacteriol**, n.173, p6558-6567, 1991.

LEE PP, FERGUSON DA, JR, SARUBBI FA. *Corynebacterium striatum*: an underappreciated community and nosocomial pathogen. **J Infect**, n.50, p338–343, 2005.

LEE, K.K., KIM, J.H., CHO, J.J., E CHOI, D. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. **Int J Cosmet Sci**, 21: 71-82, 1999.

LEHMANN AND NEUMANN. **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik**, 1st ed., J.F. Lehmann, München, 1986.

LEONARD RB, NOWOWIEJSKI DJ, WARREN JJ, FINN DJ, COYLE MB. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in Intensive Care Units. **J Clin Microbiol**, n.32, p164-169, 1994.

LETEK, M.; ET AL. Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential divIVA genes as a target. **FEMS Microbiol. Lett.**, Spain, v.265, n.2, p256-263, 2006.

LEUNG, M.C.K., WILLIAMS, P.L., BENEDETTO, A., AU, C., HELMCKE, K.J., ASCHNER, M. E MEYER, J.N. Review: *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**, n.106, p5-28, 2008.

LIMA RA. Prevalência e caracterização de *Corynebacterium striatum* em infecções do trato respiratório inferior em Unidade de Tratamento Intensivo em Hospital Terciário no Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Microbiologia Médica. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2016. 79p.

LIN L., WEN SH., GUO SZ., SU XY., WU HJ., CHONG L., ZHANG HL., ZHANG WX., LI CC. Role of SIRT 1 in Streptococcus pneumonia-induced human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in A549 cell. **Mol Cell Biochem**, n.394, p199-208, 2014.

LÓPEZ AB, GIL RUIZ MT, VEGA PL, FAJARDO OM. Cystitis and haematuria due to *Corynebacterium striatum*. A case report and review. **Actas Urol Esp**, n.33, p909–912, 2009.

LÓPEZ-PUEYO MJ, BARCENILLA-GAITE F, AMAYA-VILLAR R, GAMACHO-MONTEIRO J. Antibiotic multiresistance in critical care units. **Medicina Intensiva**. n.35, v.1, p41-53, 2011.

MACAMBIRA, R.P., FORMIGA, L.B., E FORMIGA, L.C.D. Difteria: o grave prognóstico brasileiro. **J Bras Med**, n.66, p69-81, 1994.

MACGREGOR RR., *Corynebacterium diphtheriae*. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 7th ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.

MACMULLEN AR. When Good Bugs Go Bad: Epidemiology and Antimicrobial Resistance Profiles of *Corynebacterium striatum*, an Emerging Multidrug-Resistant, Opportunistic Pathogen. **Antimicrob Agents Chemother**, 24:61, 2017.

MAGALHÃES VD, FERREIRA JC, BARELLI C, DARINI AL. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, n.64, v.2, p155-161, 2005.

MAGIORAKOS, A. , SRINIVASAN, A. , CAREY, R. B. , CARMELI, Y. , FALAGAS, M. E., GISKE, C. G., HARBARTH, S. , HINDLER, J. F., KAHLMETER, G. , OLSSON-LILJEQUIST, B. , PATERSON, D. L., RICE, L. B., STELLING, J. , STRUELENS, M. J., VATOPOULOS, A. , WEBER, J. T. AND MONNET, D. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, n.18, p268-281, 2012.

MAH TF, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, n.9, v.1, p34-39, 2001.

MAHE A. Bacterial skin infections in a tropical environment. **Curr Opin Infect Dis**, n.14, v.2, p123-126, 2001.

MAKI DG., WEISE CE., SARAFIN HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **N Engl J Méd**, n.296, p1305-1309, 1977.

MARTARESCHE, C., FOURNIER, P., JACOMO, V., GAINNIER, M., BOUSSUGE, A., DRANCOURT, M. A case of *Corynebavterium pseudodiphtheriticum* Nosocomial Pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**, n.5, p722-723, 1999.

MARTIN C. Antimicrobial Prophylaxis in Surgery: General Concepts and Clinical Guidelines. **Infect Control Hosp Epidemiol**, n.15, p463-471, 1994.

MARTÍN MC, MELON O, CELADA MM, ALVAREZ J, MENDEZ FJ, VAZQUEZ F. Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. **J Med Microbiol**, n.52, p599–602, 2003.

MARTINEZ-MARTINEZ L, ORTEGA MC, SUAREZ AI. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. **J.Clin.Microbiol**, n.33, p1318-1321, 1995.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, PASCUAL A, BERNARD K, SUÁREZ AI. Antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium striatum*. **Antimicrob. Agents Chemother**, n.40, p2671–2672, 1996.

MARTINS, C.A.S., FARIA, L.M.D., SOUZA, M.C., CAMELLO, T.C.F., VELASCO, E., HIRATA JR R., THULER, L.C.S., MATTOS-GUARALDI, A.L. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.104, v.6, p905-913, 2009.

MARULL J, CASARES PA. Nosocomial valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: a case report. **Cases J**, n.1, p388, 2008.

MASCINI E.M., VERHOEF J. Anaerobic Gram-Positive Nonsporulating Bacilli In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. New York: Churchill-Livingstone, 2000.

MASUDA H, MASAI T, TAKATANI M, KATO H. A life-threatening infection due to *Corynebacterium striatum*: a lesson learned. **Interact CardioVasc Thorac Surg**, 2017.

MATTOS-GUARALDI AL., FORMIGA LCD., CAMELLO T.C.F. ET AL. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. **Rev Argentina de Microbiol**, n.33 v.2, p96-100, 2001.

MATTOS-GUARALDI A.L, FORMIGA L.C.D. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. **Braz J Med Biol Res**, n.24, p399–406, 1991.

MATTOS-GUARALDI, A.L., E FORMIGA, L.C. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. **Curr Microbiol**, n.37, p156-158, 1998.

MC ELVANIA, TEKIPPE E, THOMAS BS, EWALD GA, LAWRENCE SJ, BURNHAM C-AD. Rapid emergence of daptomycin resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatu* a cautionary tale. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n.33, p2199–2205, 2014.

MEISEL, J.D., E KIM, D.H. Behavioral avoidance of pathogenic bacteria by *Caenorhabditis elegans*. **Trends in immunology**, n.35, p465-470, 2014.

MEYER DK, REBOLI AC. Others Corynebacteria and *Rhodococcus*. In: GL Mandell, R Dolin, JE Bennet, **Principles and practice of infectious diseases**, Churchill-Livingstone, New Ypork, p.2465-2478, 2005.

MILLAR O.S., COOPER O.N., KAKKAR V.V., SCHWARTZ M., SCHEIBEL E. Invasive infection with *Corynebacterium diphtheriae* among drug users. **Lancet**, n.339, p1359-1359, 1992.

MIORNER H, MYHRE E, BJORK L, KRONVALL G. Effect of Specific Binding of human albumin, fibrinogen and immunoglobulin G on surface characteristics of bacterial strains as revealed by partition experiments on polymer phase system. **Infect Immunol**, n.29, p879-885, 1980.

MIURA FK, ANDRADE AF, RANDI BA, ET AL. Cerebrospinal fluid shunt infection caused by *Corynebacterium sp*: case report and review. **Brain Inj**, n.28, p1223-1225, 2014.

MOHAMED, E.O.; MILLER, R.O. Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. **Microbiol**, n.65, p2025-2031. 1999.

MOHAMMADI NS, MAFAKHERI S, ABDALI N, BÁRCENA-URIBARRI I, TAUCH A, BENZ R. Identification and characterization of the channel-forming protein in the cell wall of *Corynebacterium amycolatum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1828, p2574-2582, 2013.

MORAES MN, SILVEIRA WC, TEIXEIRA LE, ARAÚJO, ID. Mecanismo de adesão bacteriana aos biomateriais. **Revista Médica de Minas Gerais**. n.23, v.1, p96-101, 2010.

MOREIRA, L. O., ET AL. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Appl. Env. Microb**, n.69, p5907–5913, 2003.

MOTA HF. Caracterização Fenotípica e Estudo do Potencial Artritogênico de Amostras Clínicas de *Corynebacterium striatum* isoladas em Ambiente Hospitalar no Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. 2014. Programa de Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

MURGA R, MILLER JM, DONLAN RM. Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. **J Clin Microbiol**, n.39, p2294–2297, 2001.

NARTEN M, ROSIN N, SCHOBERT M, TIELEN P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract isolates and influence of urinary tract conditions on antibiotic tolerance. **Curr Microbiol**, n.64, v.1, p7-16, 2012.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - CLSI. 2005. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 6th ed. Approved standard. Document M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

NEEDHAM CA, STEMPSEY W. Incidence, adherence, and antibiotic resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* species causing human disease. **Diagn Microbiol Infect Dis**, n.2, p293-299, 1984.

NEEMUCHWALA A, SOARES D, RAVIRAJAN V, MARCHAND-AUSTIN A, KUS JV, PATEL SN. *In vitro* antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. **Antimicrob Agents Chemother**, 62, 2018.

NICKEL JC, GRISTINA AC, COSTERTON JW. Electron microscopy study of an infected Foley catheter. **Can J Surg**, v.28, p50-54, 1985.

NUDEL K, ZHAO X, BASU S, DONG X, HOFFMANN M, FELDGARDEN M, ALLARD M, KLOMPAS M, BRY L. Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen of immunocompromised patients, 2018.

ODEH R, QUINN JP. Problem pulmonary pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*. **Semin Respir Crit Care Med**, n.21, p331-339, 2000.

OLENDER, A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Corynebacterium spp.* causing infections in people, antibiotic resistant bacteria - A continuous challenge in the New Millennium, Dr. Marina Pana (Ed.), 2012. ISBN: 978-953-51-0472-8, InTech, DOI: 10.5772/29418. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/antibiotic-resistant-bacteria-a-continuous-challenge-in-the-new-millennium/mechanisms-of-antibiotic-resistance-in-corynebacterium-spp-causing-infections-in-people>>. Acesso em 12 dez. 2015.

OLIVA A, BELVISI V, IANNETTA M, ANDREONI C, MASCELLINO MT, LICHTNER M, VULLO V, MASTROIANNI CM. Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. **J Clin Microbiol**, n.48, v.12, p4669-4671, 2010.

OLIVEIRA, A. C. ET AL. Healthcare-associated infection: challenges in its prevention and control. **Revista Mineira de Enfermagem**, Brazil, v.13, n.3, p445-450, 2009.

OLIVEIRA A, OLIVEIRA LC, ABURJAILE F, BENEVIDES L, TIWARI ST, JAMAL SB, SILVA A, FIGUEIREDO HC, GHOSH P, PORTELA RW, AZEVEDO VA, WATTAM AR. Insight of genus *Corynebacterium*: Ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. **Frontiers in Microbiology**, n.8, p1-13, 2017

OSMON DR, BERBARI EF, BERENDT AR, LEW D, ZIMMERLI W, STECKELBERG JM, ET AL. Infectious Diseases Society of America. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, n.56, 2013.

OSTERWALDER B., FREI R., GRATWOHL A., REBER H., SPECK B. Antibiotic-resistant *Corynebacteria*: a new problem of infection in immunosuppressed patients. **Schweiz Med Wochenschr**, n.116, v.26, p880-884, 1986.

OTEO J, ARACIL B, ALÓS JI. Bacteremias significativas por *Corynebacterium amycolatum*: um patógeno emergente. **Enferm Infec Microbiol Clin**, n.19, p103-106, 2001.

OTSUJI K, FUKUDA K, ENDO T, SHIMIZU S, HARAYAMA N, OGAWA M, YAMAMOTO A, UMEDA K, UMATA T, SEKI H, IWAKI M, KAMOUCHI M, SAITO M. The first fatal case of *Corynebacterium ulcerans* infection in Japan. **JMM Case Reports** n.4, p1-5, 2017.

OTSUKA Y, OHKUSU K, KAWAMURA Y, BABA S, EZAKI T, KIMURA S. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. **Diagn Microbiol Infect Dis**, n.54, p109-114, 2006.

OTT, L., MCKENZIE, A., BALTAZAR, M. T., BRITTING, S., BISCHOF, A., BURKOVSKI, A., E HOSKISSON, P. A. Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. **FEMS immunology and medical microbiology**, n.65, p413-421, 2012.

OVERDAHL A., LEVINE B. Eating enemy within: autophagy in infections diseases. **Cell death Differ**, n.16, v.1, p57-69, 2009.

PACHECO LG, CASTRO TL, CARVALHO RD, MORAES PM, DORELLA FA, CARVALHO NB, SLADE SE, SCRIVENS JH, FEELISH M, MEYER R, MIYOSHI A, OLIVEIRA SC, DOWSON CG, AZEVEDO V. *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxide stress. **Front Microbiol**, v.3, p1-8, 2012.

PAVIOUR S, MUSAAD S, ROBERTS S, TAYLOR G, TAYLOR S, SHORE K, LANG S, HOLLAND D. *Corynebacterium* species isolated with patients with mastitis. **Clin Infect Dis**. n.35, v.11, p1434-1440, 2002.

PELCZAR, JR. ET.AL. **Microbiologia** – Conceitos e Aplicações vol I e II. Makron Books, São Paulo, 1997.

PEREIRA GA. Interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* de origens diversas com células endoteliais humanas. Tese de Doutorado. 2007. Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

PFALLER MA.,CORMICAN MG., Microbiology: The role of the Clinical Laboratory. In: Wenzel PR. Ed. **Prevention and Control of Nosocomial Infections**. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins,1997.

PITTET D, TARARA D, WENZEL RP. Nosocomial bloodstream infection in critical ill patients. **JAMA**, n.271, p1598-1601, 1994.

PITTET D. Nosocomial Bloodstream Infections In: Wenzel PR. Ed. **Prevention and Control of Nosocomial Infections**. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins,1997.

PLOTKOWSKY MC, MEIRELLES MN. Concomitant endosome-phagosome fusion and lysis of endosomal membranes account for *Pseudomonas aeruginosa* survival in human endothelial cells. **J Submicrosc Cytol Pathol**, n.29, p229-237, 1997.

QIN L, SAKAI Y, BAO R, XIE H, MASUNAGA K, MIURA M, HASHIMOTO K, TANAMACHI C, HU B, WATANABE H. Characteristics of Multidrug-Resistant *Corynebacterium* spp. Isolated from Blood Cultures of Hospitalized Patients in Japan. **Jpn J Infect Dis**, n.70, v.2, p152-157, 2017.

RAAD I. Intravascular-catheter-related infections. **Lancet**, n. 351(9106), p893–898, 1998.

RAMOS, JULIANA NUNES. Caracterização de estirpes sugestivas de corinebactérias isoladas de sítios intravenosos. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

- REDDY, B.S., CHAUHURY, A., KALAWAT, U., JAYAPRADA, R., REDDY, G., RAMANA, B.V. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). **Indian J Med Microbiology**, n.30, p52-57, 2012.
- RENOM, F, GARAU, M, RUBI, M, RAMIS, F, GALMES, A, AND SORIANO, JB. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J Clin Microbiol**, n.6, p2064–2067, 2007.
- RIEGEL J.A. ET AL. Stimulation of fluid secretion of Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* Meig. by cyclic nucleotides of inosine, cytidine, thymidine and uridine. **J. Exp. Biol**, n.201, p3411–3418, 1998
- RIZVI M, KHAN F, RAZA A, SHUKLA I, MALIK A, RIZVI SAR, SHERWANI MK, AFZAL K, HASAN SA. Coryneforms the opportunistic Pathogens – An emerging Challenge for Immunocompetent Individuals. **American-Eurasian Journal of Scientific Research** v.6 (3), p165-171, 2011.
- ROGERS EA, DAS A, TON-THAT H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.715, p91–103, 2011.
- ROSA AC, MARIANO AT, PEREIRA AM, TIBANA A, GOMES TA, ANDRADE JR. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Microbiol**, n.47, p781-790, 1998.
- ROZDZINSKI E., KERN W., SCHMEISER T., KURRLE E. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia at a tertiary care center. **Infection**, n.19, v.4, p201-204, 1991.
- RUDRESH SM, RAVI GS, ALEX AM, MAMATHA KR, SUNITHA L, THANGAM RAMYA K. Non diphtheric *Corynebacteria*: An emerging nosocomial pathogen in skin and soft tissue infection. **Journal of Clinical and Diagnostical Research**, v.9, n.12, p19-21, 2015.
- RUFARIEL DW, COHN SE. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review. **Clin Infect Dis**, n.19, p1054–1061, 1994.
- RUTALA, W.A.; WEBER, D.J.; WOODS, G.L. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), **Guideline for Disinfection and sterilization in Healthcare Facilities**. Center for Diseases Control and Prevention. S.D.; Diag. Microb. Textbook and atlas colorido, Rio de Janeiro.; 6. 2008.
- SABBADINI, P.S., ASSIS, C.M., TROST, E., GOMES, D.L., MOREIRA, L.O., DOS SANTOS, C.S., PEREIRA, G.A., NAGAO, P.E., AZEVEDO, V.A., HIRATA, R.JR., DOS SANTOS, A.L., TAUCH, A., E MATTOS-GUARALDI, A.L. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. **Microbial Pathogenesis**, n.52, p165-176, 2012.
- SANTOS CS, SANTOS LS, SOUZA MC, DOURADO FS, DIAS AS, SABBADINI OS, PEREIRA GA, CABRAL MC, HIRATA JÚNIOR R, MATTOS-GUARALDI. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxinogenic and toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. **Microbiology and Immunology**, n.54, p1-10, 2010.

SANTOS, A.C.D. Acúmulo de colesterol por *Mycobacterium smegmatis* como possível modulador da biossíntese de lipomanana e lipoarabinomanana. [Dissertação de mestrado]. Instituto Federal do Pará, Belém, 2015b.

SANTOS, L.S., ANTUNES, C.A., SANTOS, C.S., PEREIRA, J.A., SABBADINI, P.S., LUNA, MD., AZEVEDO, V., HIRATA JÚNIOR, R., BURKOVSKI, A., ASAD, L.M., E MATTOS-GUARALDI, A.L. *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**, n.110, p662-668, 2015a.

SANTOS ED, OLIVEIRA DC, HASTREITER A, SILVA GB, BELTRAN JSO, TSUJITA M, CRISMA AR, NEVES P, FOCK RA, BORELI P. Hematological and Biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Braz.J.Vet.Res.Anim.Sci.**, São Paulo, v.53, n.2, p138-145, 2016.

SAVINI V., G. GHERARDI, M. FAVARO, C. FONTANA, R. MARROLLO, A.V. ARGENTIERI, G. DICUONZO, P. FAZII AND D. D'ANTONIO. About a bloodstream *Corynebacterium striatum* isolate. **Folia Microbiol. (Praha)** n.58, p451–453, 2013.

SCHOLLE DA. Spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum*. **J Clin Microbiol**, n.45, p656–658, 2007.

SCHRODER, J. Complete genome sequence, lifestyle, and multidrug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. **B. M. C. Genomics**, v.13, p141, 2012.

SCHULENBURG, H., EWBANK, J.J. The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular microbiology**, n.66, p563-570, 2007.

SENG P., DRANCOURT M., GOURIET F., LA SCOLA B., FOURNIER PE., ET AL. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Infect Dis**, n.49, p543–551, 2009.

SENGUPTA M, NAINA P, BALAJI V, ANANDAN S. *Corynebacterium amycolatum*: an unexpected pathogen in the ear. **J Clin Diagn Res**, v.9, n.12, p01-03, 2015.

SEVERO, C.B., GUAZZELLI, L.S. HOCHHEGGER, B. Multiple pulmonary nodules caused by *Corynebacterium striatum* in an immunocompetent patient. **Rev Inst Med Trop**, n.56, v.I, p.89-91, 2014.

SHEN Y, STOJIC S, HAAPASALO M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. **Journal of Endodontics**, v.36, n.11, p.1820–1823, 2010

SHETH N.K., FRANSON T.R., ROSE H.D., ET AL. Colonization of bacteria on polyvinyl chloride and teflon intravascular catheters in hospitalized patients. **J Clin Microbiol**, n.18, p1061-1063, 1983.

SHTONDA, B. B., E AVERY, L. Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of experimental biology**, n.209, p89-102, 2006.

- SICKLES EA, GREENE WH, WIERNIK PH. Clinical presentation of infection in granulocytopenic patients. **Arch Intern Med**, n.135, v.5, p715-9, 1975.
- SIERRA JM, MARTINEZ-MARTINEZ L, VAZQUEZ F, GIRALT E, VILA J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. **Antimicrob Agents Chemother**, n.49, p1714-1719, 2005.
- SJODEN, B., FUNKE, G., IZQUIERDO, A., AKERVALL, E. & COLLINS, M. D. Description of some coryneform bacteria isolated from human clinical specimens as *Corynebacterium falsenii* sp. **Int J Syst Bacteriol**, n.48, p69-74, 1998.
- SIMÕES, M.; PEREIRA, M.O; VIEIRA, M.J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas Fluorencens* Biofilms formed under different flow regimes. **Water Scienc. and Tech**, n.47, v.5, p217-223, 2003.
- SINGH S, SINGH SK, CHOWDHURY I, SINGH R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. **The Open Microbiology Journal**, n.11, p53-62, 2017.
- SOARES, S. C., SILVA, A., TROST, E., BLOM, J., RAMOS, R., CARNEIRO, A., ET AL. The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. **PLoS ONE**, n.8, v.1, 2013.
- SORIANO F, ZAPARDIEL J, NIETO E. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother**, n.39, p208–214, 1995.
- SOUZA CD, FARIA YV, SANT'ANNA L DE O, VIANA VG, SEABRA SH, SOUZA MC, VIEIRA VV, HIRATA JUNIOR R, MATTOS-GUARALDI AL. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.110, v.2, p242-248, 2015.
- SOUZA, M.C., SANTOS, L.S., GOMES, D.L.R., SABBADINI, P.S., SANTOS, C.S., CAMELLO, T.C.F., ASAD, L.M.B., ROSA, A.C, NAGAO, P.E., HIRATA JR R., MATTOS-GUARALDI, A.L. Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEP-2 epithelial cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.107, v.4, p486-493, 2012.
- SPENCER RC. Epidemiology of Infection in ICUs. **Intensive Care Méd**, n.4, p2-6,1994.
- STEPANOVIC S, VUKOVIC D, DAVIC I, SAVIC B, SVABIC-VLAHOVIC M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microb Meth.** n.40, p175–179, 2000.
- STEPANOVIC S, VUKOVIC D, HOLA V, BONAVENTURA G, DJUKIK S, CIRCOVIC I, RUZICKA F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, n.115, p891-899, 2007.

STEWART, P.S., Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**. n. 358, p135–138, 2001.

STAVRACAKIS-PEIXOTO, R., PEREIRA, G.A., SANTOS, L.S., SOUZA, M.C., GOMES, D.L., SANTOS, C.S., WERNECK, L.M., DIAS, A.A., HIRATA, R. JR., NAGAO, P.E., E MATTOS-GUARALDI, A.L. Invasion of endothelial cells and arthritogenic potential of endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, n.160, p537-546, 2014.

SUPERTI, SILVANA VARGAS ET AL. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. **Rev. Inst. Med. Trop**, v.51, n.2, p115-116, 2009.

SUWANTARAT N, WEIK C, ROMAGNOLI M, ELLIS BC, KWIATKOWSKI N, CARROLL KC. Practical utility and accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Corynebacterium* species and other medically relevant Coryneform-like bacteria. **Am J Clin Pathol**, v.145, p22-28, 2016.

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v.24, n.1, p.141–173, 2011.

TAN KE, ELLIS BC, LEE R, STAMPER PD, ZHANG SX, CARROLL KC. Prospective Evaluation of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System in a Hospital Clinical Microbiology Laboratory for Identification of Bacteria and Yeasts: a Bench-by-Bench Study for Assessing the Impact on Time to Identification and Cost-Effectiveness. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50(10), p3301-3308, 2012.

TEJEDOR MT, MARTIN JL, LUPIOLA P, GUTIERREZ C. Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. **Can Vet J**. v.41(2), p126-7, 2000.

TELANDER B, LERNER R, PALMBLAD J, RINGERTZ O. *Corynebacterium* group JK in a hematological ward: infections, colonization and environmental contamination. **Scand J Infect Dis**. v.20(1), p55-61, 1988.

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, p2233–2239, 1995.

THULER LC, VELASCO E, DE SOUZA MARTINS CA, ET AL. An outbreak of *Bacillus species* in a cancer hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.19(11), p856-8), 1998.

TIWARI TS, GOLAZ A, YU DT, EHRESMANN KR, JONES TF, HILL HE, ET AL. Investigations of 2 cases of diphtherialike illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Clin Infect Dis**, v.46(3), p395-401, 2008.

TON-THAT H, SCHNEEWIND O. “Assembly of pili in Gram-positive bacteria,” **Trends in Microbiology**, v.12, n.5, p228–234, 2004.

TORIBIO JA, MARRODAN T, FERNANDEZ-NATAL I. Orbital implant infection by *Corynebacterium amycolatum*. **Orbit**, v.36(5), p344-346, 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TRAN TT, JAIJAKUL S, LEWIS CT, DIAZ L, PANESSO D, KAPLAN HB, ET AL. Native valve endocarditis caused by *Corynebacterium striatum* with heterogeneous high-level daptomycin resistance: collateral damage from daptomycin therapy? **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p3461-4, 2012.

TROST E, BLOM J, SOARES SC, HUANG IH, AL-DILAIMI A, SCHRÖDER J, JAENICKE S, DORELLA FA, ROCHA FS, MIYOSHI A, AZEVEDO V, SCHNEIDER MP, SILVA A, CAMELLO TC, SABBADINI PS, SANTOS CS, SANTOS LS, HIRATA R JR, MATTOS-GUARALDI AL, EFSTRATIOU A, SCHMITT MP, TON-THAT H, TAUCH A. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. **J Bacteriol**, v.194(12), p3199-215, 2012.

TURKYILMAZ S, ESKLIZMITLILER S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from various animal clinical samples. **Turk J Vet Anim Sci**, v.30, p201-206, 2006.

VAN DAM AP, SCHIPPERS EF, VISSER LG, PEEK N, SWAAN CM, KUIJPER EJ. A case of diphtheria in the Netherlands due to an infection with *Corynebacterium ulcerans*. **Ned Tijdschr Geneesk**, n.147, v.09, p403-6, 2003.

VAN DER LELIE H, LEVERSTEIN-VAN HALL M, MERTENS M, VAN ZAAANEN HC, VAN OERS RH, THOMAS BL, VON DEM BORNE AE, KUIJPER EJ. *Corynebacterium* CDC group JK (*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. **Scand J Infect Dis**, n.27, p581-584, 1995.

VANEECHOUTTE M, DE BLESER D, CLAEYS G, VERSCHRAEGEN G, DE BAERE T, HOMMEZ J, DEVRIESE LA, RIEGEL P 1998. Cardioverter-lead electrode infection due to *Corynebacterium amycolatum*. **Clin Infect Dis**, n.27, p1553-1554, 1998.

VAUDAUX PE, WALDVOGEL FA, MORGENTHALER JJ, NYDEGGER UE. Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. **Infect Immunol**, v.45, p768-74, 1984.

VEENSTRA G, CREMERS F, VAN DIJK H, FLEER A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. **J Bacteriol**, n.178, p537-41, 1996.

VELASCO E, MARTINS CA, TABAK D, BOUZAS LF. *Bacillus subtilis* infection in a patient submitted to a bone marrow transplantation. **Rev Paul Med**, n.110(3), p116-7, 1992.

VELASCO E, THULER LCS, MARTINS CAS, DIAS LMC, GONÇALVES VMSC. Risk factors for infectious complications after abdominal surgery for malignant disease. **Am J Infect Control**, n.24, p1-6, 1996.

VELASCO E., BYINGTON R., MARTINS C.A.S., ET AL. Prospective Evaluation of the Epidemiology, Microbiology, and Outcome of Bloodstream Infections in Hematologic Patients in a single Cancer Center. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n.22, p137-143, 2003.

VELASCO E., MARTINS CA., DIAS LM., GONÇALVES VM. Nosocomial Infections in an Oncology Intensive Care Unit. **Am J Infect Control**, n.25(6), p458-462, 1997.

VELASCO, EDUARDO. Aspectos epidemiológicos de Infecções da corrente sanguínea e fatores de risco associados ao óbito em pacientes internados no hospital do câncer, Rio de Janeiro. 1998. 96f. Dissertação (Doutorado em Medicina) – Curso de Pós graduação em Clínica Médica, área de concentração em Hematologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VERA LA., MACEDO VO., MAGALHÃES AV., ET AL. Cutaneous leishmaniotic ulcers with *Corynebacterium diphtheriae*. **Rev Bras Med Trop**, v.35(4), p311-313, 2002.

VERMELHO AB, BASTOS MCF, SÁ MHBD. **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

VERROKEN A, ET AL. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. **Clin. Microbiol. Infect**, n.20, p44–50, 2014.

VISCOLI C, BRUZZI P, CASTAGNOLA E, BONI L, CALANDRA T, GAYA H, MEUNIER F, FELD R, ZINNER S, KLASTERSKY J, ET AL. Factors associated with bacteraemia in febrile, granulocytopenic cancer patients. The International Antimicrobial Therapy Cooperative Group (IATCG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Eur J Cancer**, 30A (4), p430-7, 1994.

VON GRAEVENITZ A, FROMMELT L, PUNTER-STREIT V, FUNKE G. Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures. **Infection**, v. 26, n.1, p36-38, 1998.

VUONG C, OTTO M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microb Infect**, n.4, p481-489, 2002.

WAGNER KS, WHITE JM, CROWCROFT NS, DE MARTIN S, MANN G, ET AL. Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. **Epidemiol Infect**, n.138(11), p1519-30, 2010.

WALTER S, RADEMACKHER F, KOBINGER N, SIMANSKI M, GLASER R, HARDER J. RNase 7 participates in cutaneous innate control of *Corynebacterium amycolatum*. **Scientific Reports**, v.7, p1-7, 2017.

WANG J, LONDON E. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. **Biochemistry**, n.48(43), p10446-56, 2009.

WANG J, WANG Y, DU X, CUI J, WANG K, ZHANG L, HAN Y. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China. **J Infect Dev Ctries**, n.10, p1299-1305, 2016.

WAYTERS SG, VAN BOSTERHAUT B, JANSSENS M, VERHAEGEN J. Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. **J Clin Microbiol**, n.36, p1430-2, 1998.

WEISS K, LABBÉ AC, LAVERDIÈRE M. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. **Clin Infect Dis**, n.23, p1246–1248, 1996.

WERTH BJ, HAHN WO, BUTLER-WU SM, RAKITA RM. Emergence of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum* in two patients with left ventricular assist device infections. **Microb Drug Resist**, v.22(11), p1908-1914, 2016.

WEY SB., DARRIGO LE. Infecções em Unidades de Terapia Intensiva. In Veronesi R., Focaccia R. Eds. **Tratado de Infectologia**. São Paulo,SP: Ed Atheneu, 1996.

WILSON A. P. R., MATTHEWS S., BAHL M., EFSTRATIOU A., COOKSONB.D. Screening for *Corynebacterium diphtheriae*. **J. Clin. Pathol**, v.45, p1036– 1037, 1992.

WINDMER AF., Intravenous-Related Infections. In: Wenzel PR. Ed. **Prevention and Control of Nosocomial Infections**. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1997.

WIRSING VON KÖNIG CH, FINGER H. The significance of "nonpathogenic" corynebacteria as a cause of opportunistic infections. **Immun Infekt**, n.14(5), p178-82, 1986.

WONG ES., Surgical Site Infections. In: Mayall CG Ed. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1996.

YANAGAWA R, HIRAMUNE T. *Corynebacterium renale* phage types and their epidemiological significance. **Jap. J. Vet. Res.**, v.17, p1-2, 1969.

YANG HS, KIM YJ, CHO SY, SHIN E, LEE HJ. Central venous catheter-related bloodstream infection by *Corynebacterium striatum* identified by 16S rRNA and rpoB gene sequencing. **Ann Lab Med**, v.35(5), p548-50, 2015.

YOO G, ET AL. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* bacteremia: first case in Korea. **Ann. Lab. Med**, v.35, p472–473, 2015.

YOON, S., KIM, H., LEE, Y. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. **Korean J Lab Med**, 31, p47-48, 2011.

YOUNGER JJ, CHRISTENSEN GD, BARTLEY DL, SIMMONS JCH, BARRET FF. Coagulase-negative *staphylococci* isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of *slime* production, species identification and shunt removal to clinical outcome. **J Infect Dis**, n.156, p548-554, 1987.

ZALAS P, MIKUCKA A, GOSPODAREK E. Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium amycolatum*. **Med Dosw Mikrobiol**, n.56, p327-334.

ZAPOROZHETS TS, MAKARENKOVA ID, BAKUNINA IIU, BURTSEVA IUUV, KUSAIKIN MI, BALBANOVA LA, ZVIAGINTSEVA TN, BESEDNOVA NN, RASSKASOV VA. Inhibition of adherence of *Cornebacterium diphtheriae* to human buccal epithelium by glycoside hydrolases from marine hydrobiontes. **Biomed Khim**, n.56(3), p351-359, 2010.

ZINKERNAGEL AS, VON GRAEVENITZ A, FUNKE G. Heterogeneity within *Corynebacterium minutissimum* strains is explained by misidentified *Corynebacterium amycolatum* strains. **Am J Clin Pathol**, n.106, p378-383, 1996.

ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Plataforma Brasil

http://plataformabrasil.saude.gov.br/visao/pesquisador/gerirPesquisa...

Saúde

principal sair

Eliane Cristine da Silva - Pesquisador | V3.2

Cadastros

Sua sessão expira em: 38min 31

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em um hospital terciário
 Pesquisador Responsável: Eliane Cristine da Silva
 Área Temática:
 Versão: 1
 CAAE: 40828814.0.0000.5259
 Submetido em: 15/01/2015
 Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: HOSPITAL CENTRAL DO EXERCITO



Comprovante de Receção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_432126

LISTA DE PESQUISADORES DO PROJETO

CPF/Documento *	Nome *	Atribuição *	E-mail *	Currículo *	Tipo de Análise *	Ação
979.929.687-00	Raphael Hirata Júnior	Equipe do Projeto	rhiratajunior@gmail.com	Lattes CV	PROponente	⌵
730.359.127-34	Ana Luiza de Mattos Guaraldi	Equipe do Projeto	guaraldi@uerj.br	Lattes CV	PROponente	⌵
078.825.967-56	CINTIA SILVA DOS SANTOS	Equipe do Projeto	CINTIA.MICROUERJ@GMAIL.COM	Lattes CV	PROponente	⌵
024.130.077-30	Eliane Cristine da Silva	Contato Científico, Contato Público, Pesquisador principal	elianecasilva@uol.com.br	Lattes CV	PROponente	⌵

LISTA DE COMITÊS DE ÉTICA DO PROJETO

Comitê de Ética *	Tipo de Vínculo *	Ação
5259 - UERJ - Hospital Universitário Pedro Ernesto/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro	COORDENADOR	⌵

LISTA DE INSTITUIÇÕES DO PROJETO

CNPJ da Instituição *	Razão Social *	Tipo de Instituição *	Comitê de Ética *	Ação
00.394.452/0378-72	Hospital Central do Exército	COPARTICIPANTE		⌵
	Faculdade de Ciências Médicas	PROponente	5259 - UERJ - Hospital Universitário Pedro Ernesto/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro	⌵

LISTA DE PROJETOS RELACIONADOS

Tipo *	CAAE *	Versão *	Pesquisador Responsável *	Comitê de Ética *	Instituição *	Origem *	Última Avaliação *	Situação *	Ação
P	40828814.0.0000.5259	1	Eliane Cristine da Silva	5259 - UERJ - Hospital Universitário Pedro Ernesto/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro	Faculdade de Ciências Médicas	PO	PO	Aprovado	⌵

ANEXO B – Aprovação Técnica de Projeto de Pesquisa para realização junto ao Centro de Pesquisas do Serviço de Saúde do Exército

MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO-GERAL DO PESSOAL
(Diretoria Geral do Pessoal/1860)
DEPARTAMENTO BARÃO DE SURUHY

DIEx nº 226-Sec_Cpc/AEPG/Gabdir
EB: 64446.061592/2014-93

URGENTE

Brasília, DF, 13 de novembro de 2014.

Do Diretor de Saúde

Ao Sr Diretor do Hospital Central do Exército

Assunto: Aprovação Técnica de Projeto de Pesquisa para realização junto ao Centro de Pesquisas do Serviço de Saúde do Exército

Referências: a) DIEx nº 182-DEP.DivEns/HCE, de 23 OUT 2014; e
b) DIEx nº 192-DEP.DivEns/HCE, de 23 OUT 2014.

1. Em atenção a documentação de referência sobre aprovação de Projetos de Pesquisas dos alunos militares do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, modalidade de Doutorado em Microbiologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro, esta diretoria emitiu os seguintes pareceres:

- **PROJETO:** Análise da colonização bacteriana por microorganismos multirresistentes, agentes etiológicos nas infecções pós operatórias e profilaxia pré-operatória com antibióticos em pacientes com fratura do terço proximal do fêmur do 1º Ten Med LEONARDO RIBEIRO BASTOS- Parecer **FAVORÁVEL**;

- **PROJETO:** Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium spp.* Isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em um hospital terciário da Cap QCO Vet ELIANE CRISTINE DA SILVA- Parecer **FAVORÁVEL**.

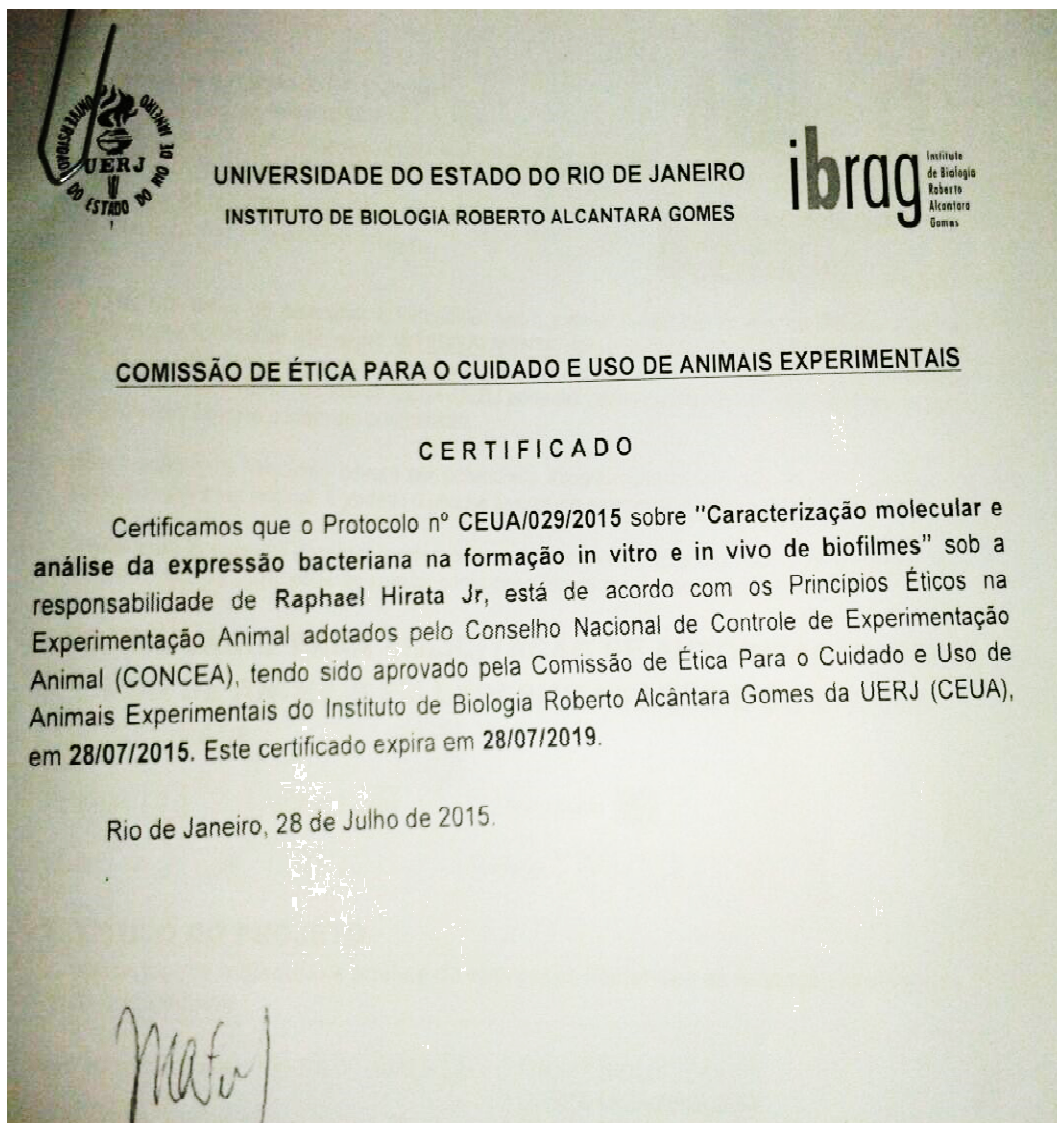
2. Informo a V Exa que devem ser ratificadas as seguintes condições:

- não haver ônus para o Exército;
- a adesão ao estudo ser de caráter voluntário e com assinatura do Termo de Consentimento, quando for o caso;
- resguardo quanto a identidade dos pacientes que farão parte da pesquisa.

3. Por fim, solicito que seja remetida cópia dos Projetos, por ocasião de suas conclusões, para análise da Subdiretoria Técnica desta Diretoria.

Detalhar Diex

Gen Bda ANTONIO ANDRÉ CORTES MARQUES
Respondendo pela Diretoria de Saúde

ANEXO C – Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
CML - 1ª RM
HOSPITAL CENTRAL DO EXÉRCITO
Hospital Real Militar e Ultramar/1769

Convidamos o (a) Sr(a) para participar da Pesquisa: “**Caracterização de aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de amostras de *Corynebacterium spp.* isoladas de infecções hematogênicas de pacientes atendidos em um hospital terciário**”, sob a responsabilidade da pesquisadora: Eliane Cristine da Silva, que pretende realizar o levantamento dos processos infecciosos hematogênicos primários ou secundários após o diagnóstico microbiológico através da bioquímica convencional e molecular. As bactérias isoladas serão utilizadas para a realização dos experimentos nos laboratórios de pesquisa da instituição Faculdade de Ciências Médicas/UERJ.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de autorização dos dados do prontuário médico e dos micro-organismos isolados das hemoculturas (cultura de sangue), que estarão disponibilizadas no Laboratório de Análises Clínicas do HCE. Os procedimentos a serem realizados na pesquisa não acarretarão em prejuízos relativos aos procedimentos a serem realizados durante o tratamento do paciente e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo.

Caso aceite em participar, estará contribuindo para a determinação de terapias antimicrobianas mais efetivas contra os micro-organismos do gênero ***Corynebacterium***, micro-organismos pouco investigados mundialmente, acerca dos tratamentos específicos e que irão favorecer de forma importante nos procedimentos a serem realizados para a população em geral.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo à sua pessoa ou dependente. O(A) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o(a) Sr(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora Eliane Cristine da Silva, no endereço: Francisco Manoel 126 – Benfica, RJ. Tel: (21) 3891-7205, ou com a Pesquisadora pelo telefone (21) 99978-9579.

Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____, (Responsável pelo paciente _____) fui informado sobre o que o pesquisador pretende realizar e o motivo da minha colaboração, entendendo as explicações. Portanto, sob minha responsabilidade, subscrevo-me concordando em participar do projeto, sabendo que não vou receber remuneração e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/____/____

Assinatura do participante/Responsável Legal (Pai ou Mãe)

Assinatura do Pesquisador Responsável