



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Cassius de Souza

Vigilância epidemiológica e caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência empregando métodos *in vivo* e *in vitro* de amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas de pacientes internados em Hospital Universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro (2009 a 2018)

Rio de Janeiro

2019

Cassius de Souza

Vigilância epidemiológica e caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência empregando métodos *in vivo* e *in vitro* de amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas de pacientes internados em Hospital Universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro (2009 a 2018)

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

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

Coorientadora: Prof.^a Dra. Lílian de Oliveira Moreira

Rio de Janeiro

2019

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

S729 Souza, Cassius de.

Vigilância epidemiológica e caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência empregando métodos *in vivo* e *in vitro* de amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas de pacientes internados em Hospital Universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro (2009 a 2018) / Cassius de Souza – 2019.
166f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza Mattos Guaraldi.
Coorientadora: Prof.^a Dra. Lilian de Oliveira Moreira.

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

1. *Corynebacterium striatum* – Epidemiologia - Teses. 2. Virologia (Microbiologia) - Teses. 3. Infecções por *Corynebacterium* - Teses. 4. Monitoramento Epidemiológico. I. Guaraldi, Ana Luiza Mattos. II. Moreira, Lilian de Oliveira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.871:616-022.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 – 6382

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

Assinatura

Data

Cassius de Souza

Vigilância epidemiológica e caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência empregando métodos *in vivo* e *in vitro* de amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas de pacientes internados em Hospital Universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro (2009 a 2018)

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

Aprovada em 29 de novembro de 2019.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Lílian de Oliveira Moreira

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Luiza Mattos Guaraldi (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Pedro Guimarães Coscarelli

Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ

Prof. Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese, primeiramente, a todos que não tiveram oportunidade de desenvolver seu conhecimento, ascender socioeconomicamente, muitos frutos de uma sociedade desigual e intolerante que por falta de oportunidades se tornam cada vez mais reféns de governos e pessoas omissas, corruptas e autoritárias, propagando neoliberalismo visando sempre seus próprios interesses, incomodados por qualquer forma de melhoria da classe proletária.

Dedico também a pesquisa, a toda comunidade médico laboratorial. Que este estudo possa se tornar um importante instrumento com fulcro à recuperação dos pacientes, estabelecendo cuidados e alertas quanto ao adequado controle dos ambientes hospitalares, principalmente com atenção de vigilância a patógenos negligenciados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por cuidar de mim e da minha família, nesta longa trajetória, concedendo-me a honra de ascender culturalmente, mesmo fruto de uma infância humilde, oriundo de uma sociedade desigual, somente o criador para abençoar-me com força e determinação para conquistar tão importante vitória.

Agradeço nesta longa e solitária caminhada, a partir do momento que decidi graduar Bacharel farmacêutico, homenagem que fiz a meu avô Edson Jaborandy Guinancio, (*in memoriam*), farmacêutico, destinava grande parte da sua vida em ajudar pessoas necessitadas, pude contar com a amizade e solidariedade de diferentes pessoas e instituições na ausência de tais colaborações o êxito desta pesquisa seria improvável:

Primeiramente a toda minha família, em especial a meus pais Francisco Carlos Dias de Souza (*in memoriam*) e Cleonice Guinancio Dias de Souza (*in memoriam*) por todo amor e estabelecimento sobre a importância da ética e honestidade, obtidas logo assim que os primeiros ensinamentos puderam ser por mim biologicamente sintetizados, além da minha esposa (Cileda da Costa Ferreira) e filho (Felipe Dias) que compreenderam a importância do conhecimento em minha vida e não mediram esforços na compreensão, fornecendo o apoio necessário neste longo processo e aos meus irmãos Carla e Carlos pela manutenção do meu estado familiar na cumplicidade límpida e união no cuidado de nossa irmã especial, Cristiane de Souza, a ela devo o amor e o compromisso de sempre fazer o melhor possível ao seu limitado bem-estar.

A minha tão especial minha Mãe Científica, Prof^a. Dr^a. Orientadora Ana Luíza de Mattos Guaraldi, meu eterno agradecimento, pela inestimável orientação, confiança, dedicação, amizade, carinho e ensinamentos que contribuíram para minha experiência laboratorial e acadêmica além dos diálogos e da sincera amizade. Sou grato pelos feriados e finais de semana perdidos em prol da realização das etapas deste trabalho.

A minha dedicada coorientadora, Prof^a. Dr^a. Lílian de Oliveira Moreira pelo apoio e valiosas contribuições para o desenvolvimento desse extenso trabalho de pesquisa. Acima de tudo, obrigado por continuar a me acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

Ao saudoso Professor Raphael Hirata Júnior (*in memoriam*), sempre tão disponível, chamado por muitos de oráculo pelo grande conhecimento e domínio em diferentes áreas da vida acadêmica, sempre disposto a compartilhar com seus alunos. A comunidade acadêmica

sente sua ausência, mas o conforto real é saber que ele estará presente nas lembranças de todos seus alunos e amigos.

As minhas colegas Dr^{as}. Cíntia da Silva Santos e Louisy Sanches dos Santos, pela grandiosa ajuda em diferentes etapas deste estudo, pelos apoios administrativos e logísticos, sem eles o desenvolvimento deste estudo seria impossível.

Aos coordenadores e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas bem como o Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aos vários docentes e profissionais da área de Ciências Médicas que prescindiram de algum do seu precioso tempo a fim de colaborar com a realização deste estudo, em especial aos profissionais, docentes e alunos do Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica, em especial meus amigos: Higor Franceschi, Yuri Vieira Faria, Lincoln Sant'Anna, Liliane Simpson, Fellipe Cabral, Monica Cristina de Souza, Cecília da Silva, Bárbara Nogueira, Paula Afonso e Bruna Sued.

Agradecimento especial aos professores: Sergio Eduardo Longo, Fracalanza da UFRJ, Verônica Viana Vieira do Instituto Oswaldo Cruz e Sergio Seabra da Universidade da Zona Oeste, pelas importantes etapas de identificação proteômica, caracterização molecular e ensaios de Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A centenária corporação da Polícia Militar do Rio de Janeiro, grato pelas readaptações nos horários e consequente viabilidade deste estudo, agradeço especialmente: meus comandantes diretos: Major Ronaldo de Almeida, Capitão Ronalde e Tenente Ruy Rodrigues, além dos meus colegas de seção: Subtenente Leandro Paulo e Sergio Nunes e Sargentos Siqueira Maria e Alexandro Rocha.

As agências de fomento: CAPES, CNPq, PRONEX, FAPERJ e SR2-UERJ pelos auxílios financeiros para o desenvolvimento deste projeto.

É necessário cuidar da ética para não anestesiar a nossa consciência e começarmos a achar que tudo é normal.

Mario Sergio Cortella

RESUMO

SOUZA, Cassius de. **Vigilância epidemiológica e caracterização fenotípica e molecular de fatores de virulência empregando métodos *in vivo* e *in vitro* de amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas de pacientes internados em Hospital Universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro (2009 a 2018)**. 2019. 166f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Recentemente se observa o aumento no relato de infecções nosocomiais por *Corynebacterium striatum*, principalmente em pacientes submetidos a procedimentos invasivos. Entretanto, estudos sobre fatores que possam contribuir para a virulência de *C. striatum* permanecem escassos. Nesse sentido, objetivamos a vigilância epidemiológica, caracterização fenotípica e molecular de fatores clínicos, microbiológicos e de virulência de amostras de *C. striatum* isoladas de pacientes internados em Hospital Universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro. Os microrganismos foram submetidos às seguintes avaliações quali e quantitativas: (i) interações com superfícies abióticas *in vitro* (poliuretano, poliestireno, vidro, PVC, silicone e aço cirúrgico) e *in vivo* (poliuretano na região subcutânea de murinos e intraperitoneal de cobaias) e bióticas *in vitro* (proteínas séricas ou de matriz extracelular humanas – fibrinogênio, fibronectina e colágeno – e células monocíticas de linhagem U-937); (ii) susceptibilidade a agentes antimicrobianos e biocidas sob diferentes condições de tratamento; (iii) natureza da composição de biofilmes formados *in vitro* e *in vivo*; (iv) interação de *C. striatum* com nematóides *Caenorhabditis elegans*; (v) investigação pela técnica de PCR da presença de genes de resistência *ermX* (macrolídeos), *tetA* (tetraciclina), *cmxB* (cloranfenicol) *aphA1* (amino glicosídeos) e relacionados à expressão de fímbrias *spaA*, *spaD* e *spaF* no genoma da amostras de *C. striatum*; (vi) sequenciamento parcial do genoma da amostra MDS *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 isolada de urina. Os resultados demonstraram diferenças, *in vitro* e *in vivo*, nas propriedades e no potencial de virulência de *C. striatum*. Até o presente momento a natureza multifatorial da virulência de amostras MDR e MDS de *C. striatum* foi evidenciada por diversos aspectos. Foram detectadas amostras MDR de *C. striatum* apresentando diferentes perfis clonais capazes de produzir biofilmes em diferentes níveis e substratos além de causar doenças graves, por vezes fatais, incluindo infecções hematogênicas e surtos nosocomiais. Na maioria dos casos os quadros clínicos foram relacionados a procedimentos de cateterização e principalmente a pacientes admitidos em centros de terapia intensiva submetidos a intubação endotraqueal. A maioria das amostras de *C. striatum* apresentou-se MDR além de expressar níveis variados de tolerância a desinfetantes e antissépticos de uso hospitalar testados incluindo glutaraldeído e ácido peracético considerados de alto nível, tanto para formas planctônicas quanto para as sésseis, inclusive a amostra MDS 1961 isolada de urina. Os genes *ermX*, *cmxB*, *aphA1* foram detectados apenas nas amostras MDR, enquanto o gene *spaD* foi detectado em ambas amostras, todas biofilme-positivas. As amostras de diferentes pulsotipos de *C. striatum* foram capazes de causar 60% a 100% de morte de *C. elegans* com ocorrência de bagging em todas as amostras e formação de estrelas exceto para amostra 1987. O fenótipo Dar foi observado pós-infecção com todas as amostras MDR. *C. striatum* foi capaz de produzir biofilme na superfície de cateter de poliuretano inserido no tecido subcutâneo de murinos após 48h de inoculação. Adicionalmente foram detectadas alterações hematológicas incluindo trombocitopenia e presença de agregados plaquetários, além de, anisocitose e leve policromasia, aumento do número de neutrófilos segmentados, e presença discreta de monócitos ativados na hematoscopia, sugerindo uma inflamação e/ou reação infecciosa. Habilidades como formar biofilmes em superfícies diversas que constituem a maioria dos dispositivos utilizados no ambiente hospitalar, resistência e/ou tolerância a múltiplas drogas, difícil identificação e escassez de estudos sobre aspectos relativos a seus fatores de virulência colaboram para o estabelecimento e disseminação de *C. striatum* em ambiente hospitalar, tornando *C. striatum* um patógeno perigoso. Desta forma, novos estudos esclarecendo características fenotípicas e moleculares permanecem necessários para o

conhecimento e conseqüentemente adoção de medidas eficientes para o diagnóstico, controle e erradicação das infecções por *C. striatum*.

Palavras-chave: *Corynebacterium striatum*. Infecções relacionadas à assistência em saúde. Vigilância epidemiológica. Caracterização molecular. Virulência. Surto nosocomial.

ABSTRACT

SOUZA, Cassius de. **Epidemiological surveillance and phenotypic and molecular characterization of virulence factors using *in vivo* and *in vitro* methods of *Corynebacterium striatum* samples isolated from patients admitted to a University Hospital located in the metropolitan region of Rio de Janeiro (2009 to 2018)**. 2019. 166f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

We recently observed an increase in the report of nosocomial *Corynebacterium striatum* infections, especially in patients undergoing invasive procedures. However, studies on factors that may contribute to *C. striatum* virulence remain scarce. In this sense, we aim the epidemiological surveillance, phenotypic and molecular characterization of clinical, microbiological and virulence factors of *C. striatum* samples isolated from patients admitted to a University Hospital of the metropolitan region of Rio de Janeiro. Microorganisms were qualitatively and quantitatively submitted to the following evaluations: (i) interactions with abiotic surfaces (polyurethane, polystyrene, surgical steel, glass, PVC and silicone) and biotics *in vitro* (human sera/matrix proteins - fibrinogen, fibronectin and collagen - monocytic U-937 mice cells) and *in vivo* (mouse subcutaneous and guinea pig liver regions); (ii) susceptibility to various antimicrobial agents and biocides subjected to different treatment conditions; (iii) nature of biofilm composition produced *in vitro* and *in vivo* (iv) *C. striatum* interaction with *Caenorhabditis elegans* nematodes (v) investigation of the presence of *ermX* (macrolides) *tetA* (tetracycline), *cmxB* resistance genes (chloramphenicol) *aphA1* (amino glycosides) and related to the expression of *spaA*, *spaD* and *spaF* fimbriae in the genome of *C. striatum* strains by PCR assays; (vi) partial genome sequencing of MDS *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 urine strain. Data currently demonstrated different properties of *C. striatum* virulence potential observed *in vitro* and *in vivo* experiments. The multifactorial nature of virulence of *C. striatum* MDR and MDS samples has been evidenced by several aspects. *C. striatum* MDR samples were detected with different clonal profiles capable of producing biofilms at different levels and substrates as well as causing serious, sometimes fatal diseases, including hematogenous infections and nosocomial outbreaks. In most cases, clinical findings were related to catheterization procedures and mainly to patients admitted to intensive care centers undergoing endotracheal intubation; (ii) gene expression and tolerance and/or resistance behaviour to different antimicrobial agents including antibiotics and biocides used in the nosocomial environment. The majority of *C. striatum* strains were MDR. Both planktonic and sessile forms, including the MDS 1961/ urine strains also expressed varied tolerance levels to hospital disinfectants and antiseptics tested including high-level glutaraldehyde and peracetic acid. The *ermX*, *cmxB* *aphA1* resistance genes were detected only in MDR strains, unlike the *spaD* fimbriae expression-related gene that was detected in both MDS and, all biofilm positive MDR strains. (iii) *C. striatum* of different pulse types were able to cause 60% to 100% death of *C. elegans*. Bagging capacity was detected in 100% of the strains, while star formation was observed only with the same samples that caused the death of 100% of the nematodes. The Dar phenotype was observed post-infection with all MDR strains; (iv) the murine model experiments demonstrated that *C. striatum* was able to produce biofilm on the surface of polyurethane catheter inserted into the dorsal subcutaneous tissue 48h post inoculation. In addition, hematological changes, including thrombocytopenia and presence of platelet aggregates were detected, as well as anisocytosis and mild polychromasia, increased number of segmented neutrophils, and discrete presence of activated monocytes on hematology, suggesting inflammation and/or infectious reaction. The ability of biofilm formation on varied surfaces that may be present on the structure of several medical devices used in the hospital environment, their resistance profiles and/or tolerance to multiple drugs, difficulty in identification and lack of studies on aspects related to their virulence factors may be favoring the establishment and dissemination of *C. striatum* in a hospital setting, making *C. striatum* a dangerous pathogen. Therefore, additional studies clarifying phenotypic and molecular characteristics remain necessary

for the knowledge and consequently the adoption of efficient measures for the correct isolation, diagnosis and eradication of *C. striatum*.

Keywords: *Corynebacterium striatum*. Healthcare associated infections. Epidemiological surveillance. Molecular characterization. Virulence. Nosocomial outbreak.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Características fenotípicas utilizadas na diferenciação de gêneros de Bastonetes Gram-positivos.....	17
Quadro 2 –	Espécies medicamente relevantes de corinebactérias.....	19
Quadro 3 –	Principais espécies não toxinogênicas de corinebactérias relacionadas com processos infecciosos em humanos.....	27
Figura 1 –	28
Quadro 4 –	Fases de desenvolvimento de um biofilme em superfície abiótica.....	
	Características dos principais biocidas utilizados em ambientes de assistência à saúde.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Padrão de aderência do tipo agregativo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BGPIs	Bastonetes Gram-Positivos Irregulares
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCIH	Comissão de Controle as Infecções Hospitalares
C°	Grau Celsius
CFE	Conselho Federal de Farmácia
CTI	Centro de terapia intensiva
CTQ	Centro de terapia e quarentena
CX	Clorexidina
DAN	Desinfecção de alto nível
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade Óptica
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
EPS	Exopolissacarídeo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GA	Glutaraldeído
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IRAS	Infecções relacionadas a assistência a saúde
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MDR	Multiresistência aos agentes antimicrobianos
MDS	Multisensibilidade aos agentes antimicrobianos
Nm	Nanometro
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
PFGE	<i>Eletroforese de campo-pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis)</i>

pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
SESDEC	Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil
TSA	<i>Trypticase Soy agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VK	Virkom
VK24	Virkom com 24h de diluido
VK48	Virkom com 48h de diluído

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	ASPECTOS HISTÓRICOS, CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO GÊNERO <i>CORYNEBACTERIUM</i>	16
1.1	Conceitos gerais das corinebactérias	16
1.2	Epidemiologia das infecções pelo <i>Corynebacterium striatum</i>	20
1.3	A multirresistência do <i>Corynebacterium striatum</i>	22
1.4	Diagnóstico laboratorial das corinebactérias em especial de <i>C. striatum</i>	23
1.5	Biofilmes bacterianos	25
1.6	O uso de agentes biocidas para controle microbiano no ambiente hospitalar	33
1.7	Utilizações de modelos experimentais na pesquisa clínica	39
1.8	Corinebactérias de relevância clínica e sua inserção no contexto das IRAS	43
2	JUSTIFICATIVA	43
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Artigo 1 - <i>Corynebacterium striatum</i> associated with nosocomial outbreak (Artigo publicado)	47
4.2	Artigo 2 - Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer <i>Corynebacterium striatum</i> (Artigo publicado)	55
4.3	Artigo 3 - Draft Genome Sequence of <i>Corynebacterium striatum</i> 1961 BR-RJ/09 a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient (Artigo publicado)	58
4.4	Artigo 4 -Virulence potential of <i>Corynebacterium striatum</i> towards <i>Caenorhabditis elegans</i> (Artigo publicado)	68
4.5	Artigo 5 - Tolerance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm associated forms of <i>Corynebacterium striatum</i> (Artigo submetido) ...	80
5	DISCUSSÃO	110
	CONCLUSÕES	133

REFERÊNCIAS	137
APÊNDICE A – Contribuição acadêmica durante o período do doutorado.....	161
APÊNDICE B – Participação em eventos internacionais.....	162
APÊNDICE C – Participação em eventos nacionais.....	164
APÊNDICE D – Coorientações e colaborações acadêmicas.....	166

INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de doenças infecciosas causadas por microrganismos emergentes, incluindo surtos nosocomiais, apresentam grande agravo para saúde pública (LUNA ET AL., 2012).

Diferentes estudos vêm sendo relatados associando bastonetes Gram-positivos irregulares (BGPIs), também chamados como corineformes e/ou “difteróides” (BERNARD 2012), como agentes etiológicos de infecções humanas significativas, incluindo infecções do trato respiratório (DIEZ-AGUILAR et al., 2013), infecções de sítio cirúrgico (CACOPARDO et al., 2013), infecções de próteses articulares (CAZANAVE et al., 2012), endocardite (FERNANDEZ GUERRERO et al., 2012), osteomielite (MOYAD et al., 2013) e outras infecções. No entanto, estudos escassos, dificuldade de diferenciação entre o gênero e os impactantes fatores de virulência, permitem a inexistências de medidas adequadas para o controle das corinebactérias (FUNKE et al., 1997; SOUZA et al., 2015).

Atualmente a relevância do isolamento de BGPIs tem sido negligenciada, resultando no atraso na implementação de terapia adequada e consequente agravamento do quadro clínico do paciente. O reconhecimento de infecções causadas por corinebactérias depende muito da habilidade dos laboratórios na identificação das espécies. Poucos laboratórios dispõem de recursos qualificados para a caracterização fenotípica e/ou genotípica de BGPIs.

Corynebacterium striatum tem sido cada vez mais associado a infecções graves em hospedeiros imunocompetentes (BAIO et al., 2013) e imunocomprometidos (QIN et al., 2017). Isolados de *C. striatum* emergiram como patógenos nosocomiais em países industrializados e em desenvolvimento, como a Arábia Saudita (BABAY; KAMBAL 2004), Estados Unidos (LEE et al., 2005) , Japão (OTSUKA et al. 2006), Espanha (RENOM et al., 2007, 2014; GOMILA et al., 2012), Itália (CAMPANILE et al. 2009; IARIA et al. 2007), Brasil (BAIO et al., 2013), Bélgica (TUMBARELLO et al., 1994; VERROKEN et al. 2014) e China (WANG al., 2014). Propagação hospitalar de cepas de *C. striatum* MDR, se intensifica principalmente em pacientes hospitalizados e admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI) e enfermarias cirúrgicas por longo prazo, geralmente com exposição prolongada a antibiótico terapia de amplo espectro muitos fazendo uso de dispositivos médicos contínuos inclusive equipamentos de recuperação respiratória (MASSUDA et al., 2018; WERTH et a., 2016). Conseqüentemente, a patogenicidade de *C. striatum* não deve ser subestimada, principalmente porque seus fatores de

virulência estão diretamente relacionados a ambientes de assistência a saúde e contribuindo diretamente com as IRAS, portanto, necessitam de mais investigação.

1. ASPECTOS HISTÓRICOS, CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO GÊNERO *CORYNEBACTERIUM*

1.1 Conceitos gerais das corinebactérias

O gênero *Corynebacterium* pertence à classe *Actinobacteria*, ordem *Corynebacteriales* e família *Corynebacteriaceae*. São caracterizados como: bastonetes Gram-positivos (BGP), catalase-positivos, não esporulados, imóveis e exibem morfologia celular pleomórfica, podendo se apresentar sob as formas cocóides, bacilares e filamentosas, individualmente, em pares e/ou paliçada. Algumas espécies apresentam grânulos metacromáticos que são reservas de fosfatos de elevada energia (BARON et al., 1994; BIBERSTEIN et al., 1994; COLLINS et al., 1996; HOLT et al., 1994; LEHMANN & NEUMANN 1896; QIN et al., 2017).

A reclassificação taxonômica das corinebactérias é frequente, conforme aumenta o grau de conhecimento relativo às suas características fenotípicas e genotípicas, dificultando ainda mais, a valorização microbiológica e clínica do isolamento, a escolha do esquema de identificação para o diagnóstico laboratorial e a identificação de gênero e espécies. Em virtude da relevância clínica é recomendável a caracterização e provas diferenciais para os gêneros apresentadas no **quadro 1**.

Quadro 1 - Características fenotípicas utilizadas na diferenciação de gêneros de Bastonetes Gram-positivos

Gênero	Es po ro	A A R*	Ra mi fic aç ão	Hemó lise	Catala se	Observações
<i>Actinomyces</i>	-	-	-	-	V	Alguns aerotolerantes
<i>Arcanobacterium</i>	-	-	-	Beta	-	Pleomórfico
<i>Bacillus</i>	+	-	V	V	+	Mobilidade variável
<i>Cellulosimicrobium</i>	-	-	V	-	+	Penetração no Agar
<i>Corynebacterium</i>	-	-	-	V	+	Pleomórfico/Imóvel
<i>Erysipelothrix</i>	-	-	-	Alfa	-	Cresce de 5 a 42°C; pH 6,7 a 9,2; H ₂ S +
<i>Gardnerella</i>	-	-	-	Beta#	-	Gram-lábil
<i>Listeria</i>	-	-	-	Beta	+	Mobilidade 25 a 28°C
<i>Nocardia</i>	-	+	+	-	+	Hifas; Cresce em lisozima
<i>Oerskovia</i>	-	-	V	-	+	Penetração no Agar
<i>Propionibacterium</i>	-	-	+	-	V	Alguns aerotolerantes
<i>Rhodococcus</i>	-	+	V	-	+	Cocoides; pigmento coral
<i>Rothia</i>	-	-	+	-	V	Pleomórfico
<i>Streptomyces</i>	-	-	+	-	+	Hifas

V = Variável; AAR = Álcool-ácido resistência; #, T realizado em meio de agar sangue de coelho ou humano (3%). Fonte: FUNKE & BERNARD, 2011.

Atualmente, o gênero *Corynebacterium* inclui 132 espécies (PARTE et al., 2018), das quais aproximadamente 50 estão relacionadas a quadros de infecções em humanos (BERNARD et al., 2012; CAMELLO et al 2003; CARVALHO et al., 2018; KNOX et al., 2002).

As corinebactérias são integrantes da microbiota normal da pele e das vias respiratórias superiores, frequentemente consideradas como contaminantes, dificultando a associação destas bactérias com a doença investigada (PARTE et al., 2018).

A espécie mais conhecida do gênero é o patógeno humano *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria, uma doença infectocontagiosa de evolução aguda com manifestações locais e sistêmicas que pode acometer crianças e adultos. Em sua forma clássica, há formação de pseudomembrana acinzentada no sítio de infecção em decorrência dos efeitos da liberação de toxina diftérica e da resposta inflamatória do hospedeiro. O maior número de casos e óbitos era observado em crianças de até 4 anos de idade que não haviam sido

imunizadas com toxóide diftérico. Atualmente a doença permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade, em criança e adultos, nos diferentes continentes, apesar da implantação de programas de imunização infantil na maioria dos países (AZEVEDO et al., 2014; BITRAGUNTA *et al.*, 2010; GALAZKA, 2000; HADFIELD et al., 2000; LONDON et al., 2009; MAN et al., 2010; SAIKYA et al., 2010).

Além de *C. diphtheriae*, as espécies *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, podem carrear o gene *tox* e provocar processos infecciosos tanto em humanos como em animais (AZEVEDO, 2014 DIAS *et al.*, 2010; MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR 2010; SETO et al., 2008; WAGNER et al., 2010). *C. pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), doença que acomete rebanhos de caprinos e ovinos; sua prevalência é alta em várias regiões do mundo, incluindo a América do Sul. No Brasil ela é endêmica, podendo atingir 70% do rebanho ovino/caprino, e uma vez que, a erradicação da doença no rebanho é difícil devido à resposta ineficaz ao tratamento com antimicrobianos, recomendando-se a excisão cirúrgica dos abscessos e dos linfonodos afetados, a LC gera perdas econômicas consideráveis (DORELLA et al., 2006).

Diferentes espécies do gênero *Corynebacterium* emergiram nas últimas décadas como patógenos hospitalares (**Quadro 2**) oportunistas e multirresistentes a antimicrobianos usados na prática terapêutica, passando a figurar como potenciais ameaças nos ambientes de assistência a saúde; entretanto, vêm sendo subestimados, tanto no diagnóstico clínicos quanto em medidas terapêuticas. As corinebactérias estão sendo reconhecidas como responsáveis diretos por infecções humanas significativas, incluindo infecções associadas ao trato respiratório. As corinebactérias foram também relacionadas a surtos nosocomiais, além de ter seus efeitos patogênicos confirmados, especialmente quando vinculadas a imunossupressão e dispositivos médicos (BAIO et al., 2013; CACOPARDO, et al., 2013; CAMPANILE et al., 2003; CAZANAVE et al., 2012; DIEZ-AGUILAR M et al., 2013).

Os principais fatores de risco para a aquisição de infecções causadas por corinebactérias são imunocomprometimento, estado geral fragilizado, longos períodos de internação em CTIs, antibioticoterapia prolongada, implantação de catéteres ou outros dispositivos médicos invasivos como, por exemplo, intubação endotraqueal e derivações encefálicas (BAIO et al., 2013; CAMELLO et al., 2003; CAMPANILE et al., 2009; MARTINS et al., 2003; RAMANA et al., 2014).

Diferentes estudos descrevem variações geográficas na frequência de isolamento e na resistência natural e adquirida, além do aumento da resistência aos agentes antimicrobianos

Quadro 2 - Espécies medicamente relevantes de corinebactérias ^a

Espécie ^b	Infecção ou local recuperado em humanos
<i>C. afermentans</i>	Septicemia, endocardite, empiema e otite
<i>C. amycolatum</i> ^{FR}	Septicemia, endocardite, peritonite e mastite
<i>C. diphtheriae</i>	Difteria, úlcera cutâneas, endocardite, septicemia, pneumonia e osteomelite
<i>C. jeikeium</i> ^{FR}	Endocardite, infecção de feridas cirúrgica e prótese, septicemia, pneumonia
<i>C. minutissimum</i>	Eritrasma, abscesso mamário, septicemia e endocardite
<i>C. propinquum</i>	Infecções sanguíneas e respiratórias, endocardite e efusão pleural
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	Pneumonia, endocardite, faringite e conjuntivite,
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Linfadenite humana, potencial em causar difteria
<i>C. striatum</i> ^{FR}	Pneumonia, endocardite, septicemia e meningite
<i>C. ulcerans</i>	Difteria, úlcera cutâneas, faringite, pneumonia, nódulos pulmonares
<i>C. urealyticum</i> ^{FR}	Infecção de Urina, ferida cirúrgica, septicemia, pneumonia, endocardite
<i>C. xerosis</i>	Infecção ferida cirúrgica, septicemia, endocardite e endoftalmite

Legenda: ^a Espécies de *Corynebacterium* mostradas aqui são patógenos vinculados a doenças. ^b Espécie *Corynebacterium*: ^{FR} Frequência de multirresistência a múltiplas drogas. Fonte: Adptado de BERNARD et al., 2005; BERNARD et al., 2012; FUNKE et al., 2011.

em espécies como: *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium macginley*, *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium jeikeium* (BAIO et al., 2013; BERNARD et al., 2012; CACOPARDO, et al., 2013; CARVALHO et al., 2018; CAZANAVE et al., 2012; DIEZ-AGUILAR M et al., 2013; FUNKE et al., 2015; SOUZA et al., 2013).

Dentre as espécies oportunistas e emergentes pentecentes ao gênero *Corynebacterium*, *Corynebacterium striatum* tem sido apontado na literatura médica como um dos principais agentes etiológicos de doenças graves incluindo surtos nosocomiais (CAMPANILE et al., 2009; QUIN et al., 2017). *C. striatum* tem sido associado a um crescente número de casos de infecções graves, diferente países como: Arábia Saudita (BABAY; KAMBAL 2004), Estados Unidos (LEE et al., 2005), Japão (OTSUKA et al. 2006), Espanha (RENOM et al., 2007 , 2014; GOMILA et al., 2012), Itália (IARIA et al. 2007; CAMPANILE et al. 2009), Brasil (BAIO et al., 2013), Bélgica (TUMBARELLO et al., 1994; VERROKEN et al. 2014) e China (WANG et al., 2014).

1.2 Epidemiologia das infecções pelo *Corynebacterium striatum*

C. striatum vem se destacando no cenário mundial pela sua capacidade de causar doenças graves, incluindo surtos nosocomiais, apresentando grande impacto no âmbito das IRAS.

Apesar do *C. striatum* ser um microrganismo saprófito, encontrado nas superfícies cutâneo-mucosas de humanos, pode acidentalmente ser introduzido como contaminante em amostras clínicas, e, portanto, não deve ser considerado como mero colonizador (DICKINSOM et al., 2001; DIEZ-AGUILAR et al., 2012; SAVINI et al., 2013).

A habilidade do *C. striatum* multirresistente aos antimicrobianos em causar surtos nosocomiais o coloca em destaque no contexto das IRAS, onde a bactéria tem sido isolada principalmente de pacientes admitidos em centros de terapia intensiva (CTIs) e submetidos a procedimentos médicos invasivos como cateterização, traqueostomia dentre outros (BAIO et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

C. striatum tem sido observado com maior frequência como um patógeno capaz da causar infecções hospitalares relacionados ao uso prolongado de antimicrobiano (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 intra-uterina (DURON; BOLTIN et al., 2009) além de sinusite e abscesso de mama (ADDERSON et al. 2008; BOLTIN et al., 2009; BRANDENBURG et al., 1996; CAMPANILE et al. 2009; MARTINS et al., 2009; OTSUKA et al., 2006).

O *C. striatum* também foi descrito como agente etiológico de infecção de trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados com doença respiratória crônica e/ou imunossupressão. Estudos descreveram as características clínicas e microbiológicas de casos de pneumonia e exacerbações das infecções respiratórias crônicas devido a *C. striatum* (BETETA LOPEZ A, et al., 2009; DIEZ-AGUILAR et al., 2012; FERNANDEZ GUERRERO ML, et al., 2013; OLIVA A, et al., 2010; SEVERO CB et al., 2014; VERROKEN A et al., 2014).

Além disso, o *C. striatum* foi isolado de caso de infecção do trato urinário em paciente ambulatorial, que não apresentava fatores predisponentes (BETETA LOPEZ et al., 2009), bem como, infecções com origem de diferentes materiais hospitalares como, cateteres (VARGAS et al., 2009; SAVINE et al 2013), laparoscópicos (REF), colonoscópios, nasofibrocópios (OLIVA et al., 2010), broncoscópios (SCHOLLE et al., 2007), materiais de urologia (BETETA LOPEZ et al., 2009) e assistência respiratória (BAIO et al., 2013), gerando quadros infecciosos principalmente em indivíduos debilitados ou imunodeprimidos (QUIN et al., 2017).

A presença de múltiplos dispositivos médicos parece facilitar a colonização do trato respiratório superior, com posterior infecção invasiva de *C. striatum*. Portanto, o *C. striatum* não deve ser subestimado e simplesmente descartado como contaminante, especialmente quando isolado em cultura pura de materiais clínicos coletados de pacientes cronicamente debilitados e/ou fazendo uso de dispositivos invasivos (BRANDENBURG et al., 1996; FERNANDEZ et al., 2014; GUERRERO et al., 2013; OLIVA et al., 2010; RENOM et al., 2007; SEVERO et al., 2014).

Surtos causados por *C. striatum* em pacientes hospitalizados por longos períodos de tempo, com exposição prolongada a antimicrobianos de amplo espectro e internados em UTIs também foram relatados (LEONARD et al., 1994; OTSUKA et al., 2006).

Em trabalho publicado por Baio e colaboradores (2013) foram descritas características fenotípicas e genotípicas de quatorze (n=14) amostras multirresistentes (MDR) e multissensíveis (MDS) de *C. striatum* isoladas durante um surto ocorrido em 2009, no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). O patógeno foi isolado de pacientes adultos atendidos em

diferentes setores do hospital, de diferentes sítios anatômicos, onde metade dos pacientes tinha 50 anos de idade ou mais. A maioria das cepas de *C. striatum* foi isolada de aspirado traqueal, de pacientes submetidos a procedimentos de intubação endotraqueal e cateterismo geralmente internados em UTIs e enfermarias cirúrgicas. Neste estudo, foram observados por eletroforese de campo pulsado PFGE (*Pulsed - Field Gel Electrophoresis*) a presença de quatro perfis clonais distintos (PFGE I, II, III e IV).

1.3 A multirresistência do *C. striatum*

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 (LÓPEZ-PUEYO, 2011; TEIXEIRA et al., 2004).

O aumento na resistência aos antimicrobianos por diferentes espécies de corinebactérias tem sido observado pelo mundo, inclusive no Brasil (BELMARES et al., 2007; MARTINS et al., 2009; REDDY et al., 2012). No Japão, exceto pela invariável atividade da vancomicina contra as corinebactérias, a variabilidade na resistência a outros antimicrobianos ressalta a necessidade de contínua vigilância dos perfis de resistência das espécies de corinebactérias (OTSUKA et al., 2006).

A resistência aos β -lactâmicos, clindamicina, eritromicina, ciprofloxacino e gentamicina tem sido relatada, levando algumas vezes ao uso de vancomicina como droga de escolha. Até o momento, vancomicina, teicoplanina e linezolida são os agentes mais eficazes *in vitro* contra as corinebactérias (BAIO et al., 2013; CAMPANILE et al., 2009; MARTINS et al., 2009; REDDY et al., 2012; SEOYOUNG et al., 2011).

Critérios específicos de avaliação de suscetibilidade aos antimicrobianos para as corinebactérias não foram completamente definidos até o momento. Porém, alguns autores sugerem que sejam relatados os casos de resistência total aos antimicrobianos, ou seja, quando houver a ausência de qualquer zona de inibição do crescimento bacteriano no teste de disco-difusão em Agar, a fim de se tentar entender o comportamento das espécies quando expostas às drogas (SAVINI et al., 2013).

Por todas as características apresentadas o comportamento de *C. striatum* passou a ser reconhecido como um patógeno emergente e tem sido relacionado a surtos epidêmicos. (BAIO

2013; CAMPANILE et al, 2009; KONEMAN, 2010; OTSUKA et al, 2006; RENOM et al, 2007; SAVINI et al, 2013).

No Japão, Otsuka e colaboradores (2006) relataram taxas variáveis da susceptibilidade do *C. striatum* aos β -lactâmicos e aminoglicosídeos, além de elevados níveis de resistência a eritromicina, tetraciclina, rifampicina e ciprofloxacina, embora todas as cepas tenham sido sensíveis à vancomicina. Adicionalmente, Renom e colaboradores (2007), descreveram que para amostras clínicas analisadas naquela oportunidade o critério de multirresistência (resistência a três ou mais antimicrobianos de diferentes famílias) se aplicava a 100% das cepas isoladas em surtos nosocomiais, dos quais 65% eram resistentes a quatro ou cinco grupos de antimicrobianos diferentes, sendo 6,9% sensíveis apenas ao imipenem e vancomicina, e 11% sensíveis somente à vancomicina.

As amostras MDR de *C. striatum* isoladas de surto nosocomial no Brasil (BAIO et al. 2013) e na Itália (CAMPANILE et al., 2009) apresentaram perfil de resistência semelhante às amostras isoladas de *C. striatum* no Japão (OTSUKA et al. 2006).

Os mecanismos de tolerância e resistência do *C. striatum* ainda não estão bem elucidados, entretanto, sabe-se que a baixa permeabilidade e o conteúdo lipídico da parede celular, ou a capacidade de formação de biofilme podem contribuir para uma possível tolerância a diversos agentes antimicrobianos. As amostras de *C. striatum* MDR e MDS indicaram sua capacidade de tolerância a biocidas utilizados em ambientes hospitalar. (CAMPANILE et al., 2009; DUARTE et al., 2009; FONTANA, 2008; LORENA; PITOMBO, 2009; MAGIORAKOS et al., 2012; STHEPHAN et al., 2004; SOUZA, 2014; SOUZA et al., 2015).

1.4 Diagnóstico laboratorial das corinebactérias em especial de *C. striatum*

Os procedimentos laboratoriais para o diagnóstico microbiológico de bastonetes Gram-positivos irregulares (BGPIs) se iniciam com o cultivo primário das amostras clínicas nos meios Ágar Chocolate Telurito, TSA (Trypticase Soy Agar) e Ágar-Sangue (FUNKE et al., 1996). A partir do isolamento primário são realizadas análise da morfologia colonial, bacterioscopia e as seguintes provas bioquímicas convencionais de identificação: catalase, metabolismo fermentativo ou oxidativo, motilidade, teste de redução de nitrato, produção de uréia, hidrólise da esculina, produção de ácido a partir de glicose, maltose, sacarose, manitol e xilose, DNase e a reação de CAMP (utilizando a estirpe de *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923). Algumas

espécies requerem lipídios para seu crescimento (FUNKE et al., 1996, JANDA, 1998, KONEMAN, 2010).

Rotineiramente, os laboratórios clínicos se valem de metodologia fenotípica convencional para identificar infecções por bactérias do gênero *Corynebacterium*. Isto se torna um grande desafio porque o gênero *Corynebacterim* apresenta uma grande variedade de espécies (**Quadro 3**). Além disso, os laboratórios não possuem provas bioquímicas suficientes para sua correta diferenciação, logo a confiabilidade se torna limitada (BERNARD, 2011; FUNKE et al., 1996, LETEK et al., 2006; WAUTERS et al., 1998). Ainda, diversos laboratórios consideram a maioria das corinebactérias como contaminantes de pele e as caracterizam apenas como “difteróides” (CAMELLO et al., 2008; JANDA, 1998). Alguns testes automatizados ou semi-automatizados baseados em testes fenotípicos tem sido utilizado por laboratórios clínicos. Estes sistemas permitem identificar bactérias de relevância clínica de forma mais rápida, no entanto, estudos vem apresentando resultados que enfatizam a baixa especificidade destes métodos (BOSSHARD et al., 2006).

Devido à similaridade fenotípica entre *C. striatum* com *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterim minutissimum* e *Corynebacterium amycolatum* estes formam um grupo de corinebactérias chamado “Complexo XSMA”, cuja identificação é um desafio gerando um diagnóstico incompleto, onde os profissionais ao identificarem o bacilo deste complexo encerram seus testes sem definir a espécie (CAMELO et al., 2003).

Por causa disso, a identificação do *C. striatum* e das demais espécies de corinebactérias, especialmente as do complexo XSMA, exige técnicas adicionais e logísticas adequadas, além da habilitação dos profissionais para realização da correta identificação. Para maior segurança na identificação e confirmação de espécies oriundas deste Complexo, alguns autores recomendam testes adicionais como: testes de suscetibilidade ao agente vibriostático O/129, fermentação da glicose a 20 °C e 42 °C, hidrólise da tirosina e CAMP (LETEK et al., 2006).

No Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (LDCIC/FCM/UERJ) foi proposto o desenvolvimento de esquema de triagem de *C. striatum* a partir do Complexo XSMA que inclui os testes fenotípicos de metabolização da maltose, hidrólise da ureia, sensibilidade ao antígeno vibriostático O/129, hidrólise da tirosina, e teste CAMP. Os ensaios preliminares mostram-se favoráveis ao uso destes testes na rotina dos laboratórios clínicos na identificação da espécie *C. striatum* (CAMELO et al., 2003).

Poucos laboratórios dispõem de recursos materiais e profissionais qualificados para a caracterização fenotípica e/ou genotípica de BGPIs, particularmente nos países em

desenvolvimento. Estudos tem demonstrado a importância de metodologias moleculares para conclusão da identificação das corinebactérias. A abordagem molecular mostra-se ferramenta útil, tanto no diagnóstico de infecções por microrganismos fastidiosos, como na identificação daqueles organismos que submetidos à metodologia fenotípica têm duvidosa identificação (BERNARD, 2011; FUNKE et al., 1996; WAUTERS et al., 1998).

A identificação de *Corynebacterium* spp. por MALDI-TOF deve ser priorizada se possível. Além disso, as metodologias de análise genotípica como o sequenciamento da subunidade ribossomal *16SrRNA* e do fragmento do gene *rpoB*, parecem ser métodos úteis para a identificação precisa das espécies do gênero *Corynebacterium* (BELTRÁN-ARROYAVE et al., 2016; KHAMIS et al., 2005). Em estudos da sequência do gene *rpoB* de espécies de *Corynebacterium*, utilizando *primers* universais para a amplificação de uma região pequena (aproximadamente 434-452 pb), mas discriminativa, foi possível determinar, através da análise das sequências, do gene *rpoB*, que dois isolados de *Corynebacterium* pertencerão a mesma espécie se apresentarem similaridade superior a 95% de para este gene (KHAMIS et al., 2005; RAOULT, LA SCOLA et al., 2004;).

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), é também uma técnica útil na identificação molecular de corinebactérias, tem sido utilizada para a identificação de linhagens bacterianas, fungos e de protozoários sendo uma poderosa ferramenta para investigações epidemiológicas em estudos de surtos hospitalares e comparações de populações microbianas de locais distintos (MAGALHÃES et al., 2005). A PFGE também tem sido utilizada por alguns pesquisadores na tipagem de espécies de corinebactérias de importância médica e veterinária, tais como: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. bovis*, *C. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium glutamicum* e *C. striatum* (BAIO et al., 2013; KHAMIS et al., 2004; TENOVER et al., 1995; WATTS et al., 2000).

1.5 Biofilmes bacterianos

O biofilme pode ser definido como um conjunto de bactérias firmemente aderidas a uma superfície, englobadas por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos produzidos pelas próprias bactérias (COSTERDON et al., 1999). O biofilme bacteriano consiste em uma forma adaptativa no ciclo biológico das bactérias para propiciar um modo de vida sésil, com características genotípicas e fenotípicas distintas que o distingue das formas bacterianas livres, denominadas formas planctônicas.

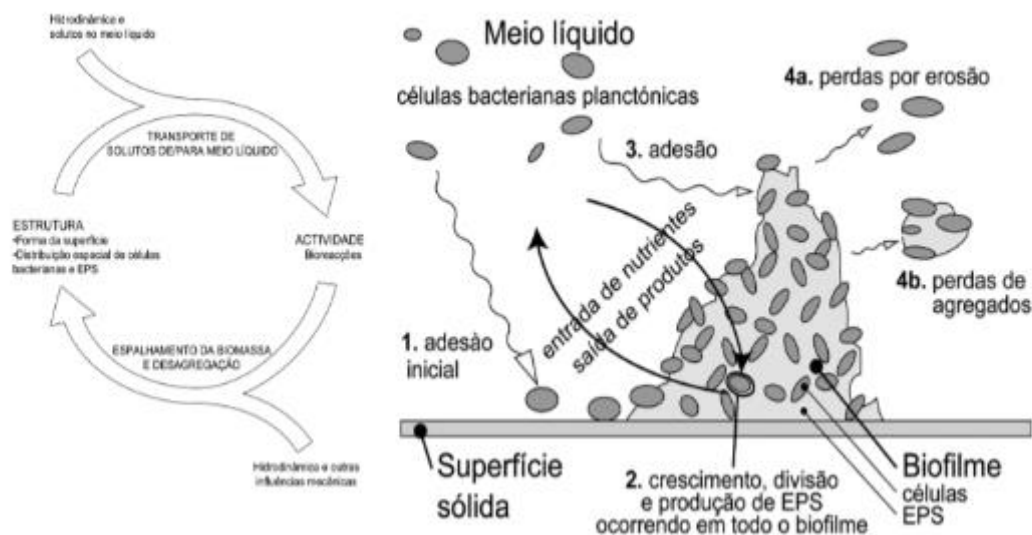
Os biofilmes podem ser formados por populações compostas de uma única ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. A formação de biofilme em instrumentos médicos, como cateteres ou implantes, válvulas cardíacas, lentes de contato, dentre outros (MOHAMED et al., 2004), pode facilitar o acesso de patógenos ao sistema hematogênico dos pacientes (EHRlich et al., 2005; HEDRICK et al., 2006; KATSIKOGIANNI et al., 2004). As infecções podem também ser provocadas pelos biofilmes formados nos dentes, da pele e no trato urinário (SARA et al., 2014; ESTRELA et al., 2018).

Quadro 3 - Principais espécies não toxinogênicas de corinebactérias relacionadas com processos infecciosos em humanos[#]

Micro-organismos ^{&}	Testes bioquímicos convencionais													Observações	
	Hemólise*	Lipoflicidade**	DNase	Cistinase ^{&}	PYZ	Reação reversa	Urease	Produção de ácido a partir de							Amido
Glicose								Glicose	Glicose	Maltose	Sacarose	Glicogênio			
<i>C. afermentans</i>	-	V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Colônias secas, cerosas, branco-acinzentadas, brilhantes com bordas irregulares. Ribose+ e frutose+. Em CTA, aparenta ser oxidativo, no entanto, é fermentativo.
<i>C. amycolatum</i>	-	-	-	-	+	V	V	-	+	+	V	V	V	-	
<i>C. jeikeium^c</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	+	V	-	-	-	-	
<i>C. minutissimum</i>	-	-	V	-	+	-	-	-	+	+	+	V	-	-	Colônias brilhantes, úmidas, branco-acinzentadas, convexas, circulares e com bordas inteiras.
<i>C. propinquum</i>	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. striatum</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	V	V	+	Colônias lisas; branco-acinzentadas; cinza-amareladas ou beges, convexas, brilhantes, úmidas, circulares e com bordas inteiras.
<i>C. urealyticum^c</i>	-	+	V	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. xerosis</i>	-	-	-	-	+	V	-	-	-	+	+	+	V	V	Cresce bem e fermenta lentamente. Colônias secas, granulares, branco-acinzentadas quase amarelas com bordas irregulares.
CDC grupo G	-	+			+	V				V					

[&], Todos catalase-positivos e esculina-negativos; *, Hemácias de carneiro; **, Bactérias lipoflicas, que crescem rapidamente em meios contendo 1% de Tween 80; [&], Atividade de cistinase observada pela produção de H₂S em meio Tinsdale ou Pisu; ^{&&}, Reação de CAMP realizado em agar sangue de carneiro semeado com *Staphylococcus aureus* produtor de beta-lisina (ATCC 25923), todas as espécies são negativas exceto *C. striatum* e *C. afermentans* que são variáveis; DNase, Atividade deoxiribonucleásica; PYZ, Atividade pirazinamidásica; +, positivo; -, negativo; V, Variável; Rev, Reação reversa. #, Fonte: FUNKE & BERNARD, 2011.

Figura 1 - Fases de desenvolvimento de um biofilme monoespecífico em superfície abiótica



Legenda: Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro. Fonte: Xavier et al., 2002 com adaptações

Durante a fase estacionária, os microrganismos alteram sua fisiologia, aumentando a produção de metabólitos secundários, como pigmentos e outras moléculas pequenas. Esses metabólitos secundários também funcionam como moléculas de sinalização que iniciam o processo de formação de biofilme ou impedem a formação de biofilme por outros organismos (ALMIRANTE et al., 2008).

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 (COSTERTON et al., 1995). A formação do biofilme é iniciada pelas bactérias circulantes, que ao entrarem em contato com uma superfície, iniciam o processo de adesão. 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 na ativação de genes específicos com a mudança do fenótipo de bactérias planctônicas para o fenótipo de biofilme, conforme ilustrado na **Figura 1** (COSTERTON et al., 1995).

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. 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. 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. A albumina adsorvida à superfície material tem mostrado efeito inibitório sobre a adesão nas superfícies cerâmicas, metálicas e de polímeros (DICKINSON 1997; COOPER et al., 1998; HERMANN et al, 2006; TEGOULIA 2002).

Estes processos ocorrem através das interações físico-químicas não específicas entre a bactéria e a superfície abiótica inanimada como plástico, aço cirúrgico dentre outros. A interação ocorre aleatoriamente, através de força gravitacional, movimento browniano ou de forma ordenada, através de mecanismos de cada patógeno, como quimiotaxia e motilidade, através de flagelos e pili, este estado é reversível, assim, vinculado por interações físico-químicas não específicas de longo alcance, incluindo forças hidrodinâmicas, hidrofóbicas, eletrostáticas e força de Vander Walls, fator primordial para determinação desta fase de adesão, estes mecanismo ainda estão em fases de estudo e não totalmente elucidados (MORAES, et al., 2013; TRENTI et al, 2013).

O biofilme bacteriano gera benefícios ao microrganismo como resistência aos antimicrobianos, bloqueio na difusão de pequenas moléculas e dificulta a fagocitose (CERI; COSTERTON, 1991).

Acredita-se que a formação de biofilmes esteja associada à proteção contra possíveis agressões no ambiente. O envoltório extracelular as protege contra agressões físicas e químicas do meio externo, como a ação de raios ultravioleta (MOHAMED; MILLER, 1999) 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 (COSTERTON, HOYLE 1991).

A produção de biofilme pelos microrganismos ocorre preferencialmente em superfícies inertes, como dispositivos médicos, mas pode também ocorrer em tecidos vivos, como ocorre em infecções invasivas. O tratamento bem sucedido, nestes casos, em longo prazo depende de doses elevadas de antimicrobianos e a remoção de qualquer corpo estranho (COSTERTON et al., 1999; COSTERTON, 2002; COSTERTON et al., 2005; DONLAN MOHAMED et al., 2004, , SOUSA et al., 2011).

Por outro lado, tem sido demonstrado que a ação de antimicrobianos sobre os biofilmes se torna extremamente reduzida em função de mecanismos de inativação exercidos pela matriz extracelular, da dificuldade de penetração no interior dos biofilmes e alteração na taxa de metabolismo das bactérias em seu interior, desta forma, bactérias em um biofilme encontram-se abrigadas e em relativa homeostase, graças à presença da matriz exopolissacarídica (EPS).

A matriz contém vários componentes: exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e outras substâncias. O exopolissacarídeo é secretado para o meio externo, sendo de diferentes composições. Ao que parece, o EPS tem diferentes estruturas e funções, dependendo das comunidades e/ou condições ambientais. Uma de suas funções é impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente. Em alguns casos o EPS é capaz de sequestrar cátions, metais e toxinas. Por estas razões, o biofilme é um fator imprescindível para a bactéria em relação a proteção a agentes externos, e ainda favorecer a transferência de genes.

As células bacterianas contidas em biofilmes são mais resistentes aos antimicrobianos comparadas com as células em seu estado planctônico (CERI et al., 2001; COSTERTON 2000).

Diversos são os problemas causados pelos biofilmes como: biocorrosão, comprometimento de dispositivos pertinentes em ambientes hospitalar, entre outros, tudo isso é acrescido ao potencial de resistência cruzada aos agentes químicos antimicrobianos (SIMÕES et al., 2003).

Infecções associadas a biofilmes geralmente são de natureza recorrente, visto que as terapias antimicrobianas convencionais eliminam predominantemente as formas planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento. Exemplos típicos de doenças associadas a biofilmes incluem as infecções de implantes tais como válvulas cardíacas, cateteres, lentes de contato, dentre outros materiais (MOHAMED et al., 2004).

Em determinados momentos, os biofilmes sofrem dispersão, liberando microrganismos que podem vir a colonizar novos ambientes. Esse processo pode ser dividido em dispersão, quando parte das células de uma colônia sofre lise e outras retomam a motilidade, sendo então liberadas da estrutura. Outro processo de dispersão é chamado de dispersão de fragmentação. Neste, porções de matriz extracelular associadas a microrganismos são liberadas. Enfim o último processo de dispersão que é chamado de dispersão superficial que ocorre pelo crescimento do próprio biofilme como um todo (SIMÕES et al., 2003).

Os biofilmes bacterianos são hoje uma das maiores preocupações entre a comunidade médica. O biofilme bacteriano é um fator de virulência que contribui diretamente para a multirresistência aos antimicrobianos

Atualmente os estudos estão sendo direcionados para identificar da natureza dos biofilmes bacterianos. Estudos apresentam a presença de diferentes substâncias, especialmente, polissacarídeos e proteínas de superfícies específicos de biofilmes. Dentre as quais: a poli- $\beta(1,6)$ -N-acetil-D-glicosamina, denominada adesina polissacarídica intercelular (PIA de bactérias Gram-positivas) (MACK et al., 1996; ROHDE et al., 2010), ácidos teicóicos, DNA, MSCRAMM (do inglês: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*; FOSTER et al., 2014; MAZMANIAN, TON-THAT; SCHINEEWIND, 2001).

Para algumas espécies de corinebactérias já foram descritas propriedades adesivas em superfícies bióticas e abióticas e de produção de biofilme, incluindo *C. diphtheriae* (GOMES et al., 2012), *C. pseudodiphtheriticum* (SOUZA, 2013) e *C. striatum* (SOUZA et al., 2015).

No estudo de Souza e colaboradores (2015) foi demonstrado que o *C. striatum* é capaz de produzir biofilme e aderir em superfície plástica o que pode contribuir no processo de formação de biofilme em dispositivos médicos (SOUZA et al., 2015). Entretanto, a composição do biofilme do *C. striatum* ainda não foi determinada.

Alguns estudos sugerem que substâncias séricas e proteínas podem favorecer a adesão inicial do biofilme, desempenhando papel importante na etapa inicial da formação de biofilme, indicando atuar semelhantemente aos receptores para as adesinas MSCRAMMs (FRANÇOIS; LEW, 1998; SOUZA 2015).

Plasmídeos bacterianos também preocupam a comunidade médica, bactéria em forma sésil pode apresentar componentes genéticos extracromossomiais capaz de transferir genes de resistências para outras bactérias. Estes podem ser transferidos horizontalmente por conjugação, para diferentes espécies presentes em um biofilme. (ELASRI; MILLER, 1999).

Bactérias em biofilmes podem apresentar maiores níveis de resistência a agentes químicos antimicrobianos incluindo desinfetantes e radiação ultravioleta (COSTERDON 2011;

CERI 2009; MILLER, 1999). Adicionalmente, outros estudos revelam que radiação ultravioleta perde eficácia sobre bactérias em estado sésil, indicando apresentar propriedade protetora à radiação ultravioleta (MOHAMED; CERI et al., 2001; MILLER, 1999). Além disso, outros diferentes problemas com relação a biofilmes bacterianos vêm sendo discutido na literatura 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).

Infecções associadas a biofilmes geralmente são de natureza recorrente, visto que as terapias antimicrobianas convencionais eliminam predominantemente as formas planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento. Para tornar o quadro ainda mais grave, as bactérias presentes nos biofilmes encontram-se mais protegidas contra o sistema imune do hospedeiro. Exemplos típicos de doenças associadas a biofilmes que incluem doenças formados nos tecidos, tais como nas infecções pulmonares, periodontite e outras que colonizam uma grande parte das superfícies direta ou indiretamente, sendo então capaz de invadir as células das mucosas e liberar toxinas (MILLER, 1999). Adesão microbiana e a formação de biofilme representam um problema de Saúde Pública sendo responsáveis por mais de 60% das infecções bacterianas humanas (COSTERTON et al., 1999).

O “National Institute of Health” (NIH-USA), afirma que os biofilmes tem relação em torno de 80% de todas as infecções médicas no mundo (2002), sendo as principais: endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções que tem relação com a fibrose cística e colonizadores de implantes biomédicos, como: cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses, estes últimos geralmente sendo as infecções mais importantes (DONLAN; COSTERTON, 2002; HOIBY et al., 2011).

O interesse no estudo em biofilmes tem ganhado grande impulso após a demonstração da relação causal entre inúmeras doenças infecciosas crônicas e hospitalares associando a infecções relacionadas a dispositivos invasivos e a presença de biofilmes bacterianos (COSTERTON, 1999). Mesmo em indivíduos com excelentes reações imunes celulares e humorais, essas infecções são raramente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (STEWART et al., 2001).

A presença de fímbrias em algumas espécies de corinebactérias, incluindo *C. pseudodiphtheriticum* e *C. diphtheriae*, vem sendo relatada. Entretanto a presença de fímbrias ainda não foi mencionada em *C. striatum* (YANAGAWA; HONDA, 1976),

A presença de proteínas na superfície bacteriana pode estar associada com a adesão inicial e a hidrofobicidade de superfície celular (COSTERTON et al., 1999; EIFF VON et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; SOUSA et al., 2011). Algumas espécies de corinebactérias, incluindo *C. diphtheriae*, *C. urealyticum* e *C. pseudodiphtheridicum*, foram relacionadas com capacidade de formar biofilme em substratos hidrofóbicos e hidrofílicos como poliestireno e vidro (KWASZEWSKA et al., 2006; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; 1999; ROSENBERG, 1981; SORIANO et al., 2008).

Os poliuretanos são normalmente usados em várias aplicações médicas, incluindo cateteres e tubos para fins gerais, cama hospitalar, lençóis cirúrgicos e curativos (COSTERTON, 2002; DONLAN, 2008).

Os biofilmes são complexos e estruturados com a presença de muito material extra celular de origem desconhecida. Geralmente são encontrados estudos na literatura que indicam que o aumento da síntese de exopolissacárido está muitas vezes relacionado com espécies bacterianas produtoras de biofilme em cateteres associados com infecções sintomáticas (OLSON et al., 2002).

1. 6 O uso de agentes biocidas para controle microbiano no ambiente hospitalar

Os biocidas têm sido amplamente utilizados em hospitais e outros estabelecimentos de saúde para a desinfecção e esterilização de dispositivos e superfícies. Eles desempenham um papel essencial no controle de infecções e na prevenção da transmissão de patógenos humanos. No entanto, tolerância a desinfetantes e antissépticos estão sendo descritos para vários patógenos nosocomiais MDR, incluindo *Mycobacterium* spp. e *Staphylococcus aureus* (LORENA et al., 2009; OTTER et al., 2015; PITOMBO et al. 2009; PARFENTJEV et al., 1964). Para esses patógenos, estudos também verificaram correlação entre suscetibilidade a biocidas e resistência antimicrobiana entre amostras isoladas de pacientes internados e outras adquiridas na comunidade.

Desinfetantes também são utilizados para inativar microrganismos no estado sésil. Resistência e ou tolerância a estes compostos eram raros (GNANADHAS, 2013), entretanto, crescente número de estudos de biofilmes microbianos resistentes a biocidas, incluindo cloro, quaternário compostos de amônio e aldeídos, vem trazendo preocupação para a comunidade médico laboratorial. Estes autores sugerem que bactérias em biofilmes são mais resistentes aos

tratamentos com biocidas (BRIDIER et al., 2011; DAVISON et al., 2010; MASEDA et al., 2009; SANCHEZ et al., 2005; SMITH et al., 2008).

A ineficácia de biocidas sobre determinados microrganismos é atribuída a mecanismos físicos, como a penetração limitada destes agentes através dos exopolissacarídeos, reatividade e absorção de biocidas à matriz de biofilme e adaptações fenotípicas (BRIDIER, et al., 2011; POOLE et al., 2002; VAN ACKER et al., 2014). Estratégias eficazes de desinfecção de biofilme necessitam, portanto, da compreensão dos mecanismos de ação dos antimicrobianos e de resistência a biocidas.

A formação de biofilme pode facilitar a colonização e infecções nas superfícies epiteliais humanas que, independentemente da pressão seletiva dos antibióticos, são favorecidas pela presença de dispositivos médicos invasivos, incluindo cateteres e tubos endotraqueais, isso se agrava pelo fato de que alguns materiais médicos são submetidos previamente à processos inadequados de desinfecção de alto nível, aumentando o índice de contaminação dos pacientes por esta via.

O controle do crescimento de microrganismos pelos métodos químicos pode levar à eliminação total ou parcial desses microrganismos. Dentre os métodos de eliminação parcial de microrganismos em materiais, ambientes e tecidos vivos, destaca - se a desinfecção e antissepsia.

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 (RUTALA et al., 2008).

Os agentes químicos são utilizados para controlar o crescimento bacteriano tanto em tecidos vivos como em objetos inanimados.

Nenhum desinfetante isolado será apropriado para todas as circunstâncias. Um importante diferença entre os desinfetantes e os antissépticos está o grau de toxicidade, onde os desinfetantes atuam eliminando e/ou inibindo a multiplicação de microrganismos em superfícies e materiais inanimadas, enquanto que os antissépticos atuam eliminando e/ou inibindo a multiplicação de microrganismos em tecidos vivos (VERMELHO et al., 2007).

O processo de desinfecção pode ser classificado como de (I) alto nível, onde o agente químico tem ação em formas vegetativas incluindo em micobacterias, esporos bacterianos, fungos e vírus, (II) nível intermediário. O agente químico não tem ação nos esporos bacterianos e (III) nível baixo, onde o agente químico possui ação somente em formas vegetativas bacterianas, ou seja, não há diferença por definição significativa entres estes dois últimos níveis,

o que vai variar de acordo com cada processo de desinfecção (BOND; FAVERO 1991; MCDONNELL, 2007).

No **Quadro 4**, a classificação de acordo com a utilização dos principais biocidas utilizados na atualidade, em ambientes de assistência à saúde.

Quadro 4 – Características dos principais biocidas utilizados em ambientes de assistência a saúde

Biocidas	Concentração	Ação antimicrobiana	Espectro de ação	Referências
Glutaraldeído	2%	Desinfecção Preservação Esterelização	Alto nível ^a	RUTALA 2008; ANVISA 2007;
Ácido peracético	2%	Desinfecção Esterelização	Alto nível	MORAIS 1997
Hipoclorito de sódio	1%	Desinfecção Limpeza	Nível Intermediário ^b	MCDONNELL E RUSSELL 1999; ANVISA 2016;
Monopersulfato de potássio (VIRKON®)	1%	Desinfecção	Alto nível	DUNOWSKA ET AL. 2005; MATSUOKA ET AL 2017; MARTIM, 2013
Álcool etílico/Clorexedina	70%	Antissepsia Desinfecção Preservação	Baixo nível	MCDONNELL E RUSSELL 1999; WIJESINGHE E WEERASINGHE 2010

Legenda: ^a - Biocidas de alto nível são recomendados para esterilização e desinfecção de nível superior; ^b - biocidas de nível intermediário, recomendados para esterilização de materiais críticos; recomendado para desinfecção de material semi-crítico; c, recomenda-se biocida de baixo nível para pele ou superfícies intactas; tempo de contato com base nas recomendações do fabricante; VIRKON®, um desinfetante multiuso contendo (monopersulfato de potássio), decilbenzenossulfonato de sódio, ácido sulfâmico e tampões inorgânicos. Fonte: O Autor, 2019.

A DAN em geral é aplicada em instrumentos cirúrgicos ou outros materiais com fins semelhantes classificados como críticos e semicríticos, onde o agente químico realiza a desinfecção por um período de mínimo de 30 minutos. Os artigos destinados à penetração da pele e mucosas adjacentes, nos tecidos sub-epiteliais e no sistema vascular, bem como, em todos os que estejam diretamente conectados com este sistema, são chamados de artigos críticos. De forma geral, artigos críticos requerem esterilização para satisfazer os objetivos a que se propõem. Já os artigos destinados ao contato com a pele não íntegra ou com mucosas íntegras, por exemplo, endoscópios, lâminas de laringoscópios e diafragma, são chamados de artigos semicríticos e requerem desinfecção ou esterilização, dependendo do fim a que se destinam.

Esses materiais devem ser livres de microrganismos, entretanto, é permitido um pequeno número de esporos bacterianos. Os materiais não críticos são aqueles que entram em contato com a pele intacta, mas não com as membranas mucosas, e a pele atua como uma barreira efetiva contra possíveis patógenos, por isso a esterilidade dos artigos não é essencial (FAVERO, 1987; GUVERICHI, et al., 1990; RUTALA; WEBER, 2008).

Descontaminação é um termo usado para descrever um processo ou tratamento que torna um material hospitalar, instrumento ou superfície, seguro para o manuseio e uso. Um processo de descontaminação não significa, necessariamente, que este material está seguro para sua utilização no paciente, uma vez que, o procedimento de descontaminação pode variar desde seguros para o manuseio, tornando a desinfecção e esterilização mais fáceis, menos dispendiosas e com menor probabilidade de carrear material pirogênico (VERMELHO et al., 2007).

A descontaminação prévia tem sido realizada pela imersão dos materiais médicos-cirúrgicos com presença de matéria orgânica, microrganismos e outros resíduos decorrentes do uso, em uma solução desinfetante por um tempo de exposição que varia de 15 a 30 minutos, objetivando-se a eliminação ou redução dos microrganismos presentes, antes de submetê-los à limpeza mecânica com água e sabão, com vista a minimizar os riscos ocupacionais (RUTALA;WEBER, 2008).

Um processo muito importante na busca por um ambiente hospitalar controlado é a escolha dos agentes químicos adequados para cada tipo de desinfecção bem como o controle de desinfecção de superfícies e materiais críticos e semicríticos, antissepsia e outros materiais de pertinência hospitalar. Procedimentos adequados de desinfecção principalmente em dispositivos pertinentes a prática hospitalar deve incluir limpeza minuciosa e à Desinfecção de Alto Nível (DAN) que elimina todos os microrganismos em forma vegetativa (vírus, fungos, bactérias e micobactérias) tendo, inclusive, ação parcial sobre os esporos (RUTALA et al., 2008).

A DAN pode ser realizada por método manual ou automatizado, atendendo requisitos estabelecidos pela regulamentação brasileira específica (ANVISA/RDC nº 35 de 2010) que dispõe sobre produtos químicos com ação antimicrobiana utilizados em materiais críticos e semicríticos. O nível de ação dos desinfetantes, exigido nesta resolução, é comprovado frente a diferentes microrganismos, dentre os quais: *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium massiliense* INCQS 00594 e *Bacillus subtilis*.

Apesar de indispensáveis para a desinfecção, biocidas podem provocar muitos danos em materiais, como endoscópios, laparoscópicos, mangueiras de equipamentos para auxílio respiratório, causando prejuízo para administração hospitalar. A corrosão é o principal dano, mas prejuízo na fixação das lentes, amolecimento do revestimento externo e incrustação de sujidade nos lumens também são eventos comuns (BEILENHOFF; RUTALA 2008). Pelo fato de serem equipamentos delicados e de alto custo há o receio de se adotar novos germicidas, especialmente quando não há autorização expressa dos fabricantes, podendo levar ao cancelamento da garantia de endoscópios novos. As maiorias dos fabricantes recomendam apenas o uso de glutaraldeído (GA). Poucos biocidas para DAN são aprovados para uso no Brasil.

O glutaraldeído (GA) é um biocida comumente usados para controlar o crescimento microbiano em unidas relacionadas a assistência à saúde. Acredita-se que o GA atue pela alquilação de grupos químicos importantes, como hidroxila, carbonila e amino, presentes nas proteínas e lipídios e, conseqüentemente, o endurecimento das camadas externas. Sua eficácia aliada com o baixo custo favorece o uso de GA, tornando-o biocida mais utilizado no mundo na concentração de 2% a 3,4% (MCDONNEL et al 2011; RUSSEL et al., 2009).

Devido aos eventos adversos, observados em pacientes e profissionais, foram publicadas normas (ANVISA RDC 15/2012; ANVISA IT 4 /2007; São Paulo - Resolução 27/2007) para o controle e utilização do GA.

Diferentes estudos relatam casos de microrganismos resistentes e/ou tolerantes ao GA, (DUARTE; KIRSCHKE et al., 2003; KAMPF et al., 2013; PITOMBO; LORENA et al 2009; 2010; SVETLÍKOVÁ et al., 2009; TSCHUDIN-SUTTER et al., 2011; SIMÕES et al., 2006; 2011).

A fim de conter surtos causados por microorganismos tolerantes ao GA foram aplicadas medidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira proibindo a esterilização química líquida e aumentando as exigências para registro de desinfetantes e esterilizantes (ANVISA – RDC 8/2009; ANVISA - RDC 31/2011; RUTALA 2008).

Uma boa alternativa para substituir o GA é o ácido peracético (AP). Sua utilização como desinfetante de alto nível de endoscópios e outros materiais da prática hospitalar é relativamente recente. O AP está comercialmente disponível em formulações aquosas ou em pó, para uso manual ou automatizado, com rápida ação sobre microrganismos vegetativos. A concentração

de seu uso e o pH da solução são fórmula-dependentes; este desinfetante age pela desnaturação proteica, aumento da permeabilidade da membrana celular pela ruptura dos radicais sulfidrílica (-Sh) e ligações de enxofre (SS), oxidando as enzimas essenciais e como pontos negativos a perda de eficácia na presença de matéria orgânica (RUTALA 2008).

O hipoclorito de sódio é um sal do ácido hipocloroso que possui um alto poder oxidante e em equilíbrio com o ânion hipoclorito, devido à carga neutra e ao pequeno tamanho, difunde-se facilmente pela parede celular das bactérias. Sua utilização se limita a superfícies físicas inanimadas como: chão, parede e outros materiais que não entram em contato direto com o paciente, graças ao seu alto poder corrosivo, sendo descartado na desinfecção em materiais críticos e semicríticos, uma vez que estes são constituídos de materiais sensíveis como plástico, borracha e metais leves (ANDRADE, 1988).

O Virkon (monopersulfato de potássio) é um agente de desinfecção, comercialmente conhecido como Virkon[®], este agente atua oxidando os grupos sulfidrílica presente nas proteínas com isso eliminando os microrganismos. Sua característica mais importante é sua atividade na presença de matéria orgânica, além de não ser corrosivo para metais. Entretanto, tem sido mais usado em materiais não críticos e possui pontos negativos, como baixa eficácia frente às micobactérias, além de ter sua atividade diminuída totalmente após sete dias de sua ativação, sem contar que necessita ser diluído mantendo o controle de sua estabilidade, por isso a necessidade de manejo por profissionais tecnicamente capacitados.

Os álcoois são compostos químicos, orgânicos, utilizados nos estabelecimentos de saúde em procedimentos de antissepsia e desinfecção de artigos ou superfícies, sendo reconhecido como um importante agente químico antimicrobiano, eficaz para remoção, destruição ou para impedir a disseminação de microrganismos.

Segundo classificação do *Center of Diseases Control and Prevention* (CDC, USA) o álcool a 70 % é mais disponível e utilizado (tanto o etanol como o 2-propanol), principalmente devido ao menor custo em comparação com outros produtos. Na prática assistencial, a aplicação direta do álcool nas superfícies contaminadas, sem limpeza prévia, é observada com relativa frequência. Esse procedimento contraria, a priori, as Boas Práticas de Controle de Infecção nos Estabelecimentos de Assistência à Saúde.

O álcool é classificado como desinfetante de nível intermediário, sendo destinado à aplicação na desinfecção de superfícies de mobiliários e equipamentos, como bandejas de medicação, ampolas e frascos de medicamentos.

O álcool etílico e o isopropílico possuem atividade contra bactérias na forma vegetativa, vírus envelopados (ex: vírus causadores das hepatites B e C), micobactérias e fungos, e não

apresentam ação contra esporos e vírus não envelopados (ex: vírus da hepatite A), destrói tanto pela desnaturação protéica, quanto pela interferência no metabolismo microbiano

Algumas características do álcool limitam seu uso: é uma substância volátil e de rápida evaporação na temperatura ambiente; é altamente inflamável; pode causar ressecamento da pele quando usado com frequência e sem adição de emolientes; pode ter diminuída sua atividade antimicrobiana na presença de altas concentrações de matéria orgânica (ANDRADE et al., 2002; SANTOS, et al., 2002; RURALA 2008).

1.7 Utilizações de modelos experimentais na pesquisa clínica

O uso de modelos animais ajuda na compreensão do processo infeccioso de diferentes espécies bacterianas. Além do modelo murino, bastante utilizado, o uso do nematódeo *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental de infecção tem emergido como importante ferramenta (ANTUNES et al., 2016).

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. Além disso, seu pequeno tamanho (~ 1 mm, quando em fase adulta), transparência, rápida reprodução, curto ciclo de vida de aproximadamente 21 dias, adaptabilidade 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 (ANTUNES et al., 2015).

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 (LEUNG et al., 2008).

Os nematódeos são capazes de distinguir a qualidade dos alimentos, mostrando preferência por bactérias com maior valor nutricional. Tem sido demonstrado que *C. elegans* é capaz de diferenciar entre bactérias diferentes através de mecanismos de comportamento de proteção contra agentes patogênicos potenciais (ANTUNES; SANTOS et al., 2015). 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 (ANTUNES; et al., 2015).

C. elegans foi estabelecido como sistema modelo para a investigação da patogenia e fatores de virulência em *C. diphtheriae* (ANTUNES et al., 2015).

Em seu habitat natural, composto de material vegetal em decomposição, este nematoide 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).

1.8 Corinebactérias de relevância clínica e sua inserção no contexto das IRAS

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) se trata de qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (FORTALEZA e PADOVEZE M et al., 2000)

As IRAS de origem bacteriana são um grave problema que contribui para o aumento da taxa de morbidade e mortalidade, bem como o aumento do custo do paciente para o sistema público ou privado de saúde. Isso se deve ao uso elevado de drogas antimicrobianas e aumento do tempo de internação. Segundo estimativa mundial acredita-se que a incidência destas IRAS varie de 7 a 10 casos a cada 100 pacientes admitidos e uma parcela significativa desta população está alocada nas UTIs (unidade de tratamento intensivo). Isso se deve a fatores de risco associados ao paciente, o tipo de unidade hospitalar e instrumentos usados nestes setores (EL FAR, MARINOS; MEDEIROS, 2001).

A busca por ambientes seguros, o direto enfrentamento contra problemas que corroboram com o surgimento de infecções, incluindo as epidêmicas são hoje uma das maiores preocupações da comunidade médica. Procedimentos relacionados a principalmente a ações

voltadas a uma rotina de diagnóstico inteligente e atualizada, bem como, o empenho e atualização técnica de todos os profissionais envolvidos nos ambientes hospitalares são fatores que podem diminuir a incidência de IRAS.

A preocupação com fatores essenciais no combate às doenças infecciosas, tais como o uso racional de agentes químicos antimicrobianos, o gerenciamento ou gestão da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) que será responsável por adotar rotinas, treinamento da mão de obra, controle das terapias antibacterianas, padronização de protocolos e ainda, atualização quanto às novas técnicas de limpeza, descontaminação e desinfecção, na utilização de agentes químicos, incluindo aplicações de testes de eficácia desses agentes sempre padronizados pela Anvisa, contribui diretamente para um ambiente controlado.

A diversidade dos fatores de virulência bacterianos aliada à habilidade de mutação e possíveis transferências gênicas, contribuem diretamente com a persistência de patógenos oportunistas, gerando o aumento do número de casos de infecções de origens diversas (CAMPELO et al., 2013; CARVALHO et al., 2018; MARTINS et al., 2009; RAMOS et al., 2014; QUIN et al., 2017).

Os BGPIs podem levar a óbito pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, apresentando multirresistência aos antimicrobianos e aos biocidas utilizados na desinfecção dos ambientes hospitalares parecem contribuir para a permanência destes microrganismos no ambiente hospitalar (BERNARD et al., 2012; CARVALHO et al., 2018; KONEMAN et al., 2008; MARTINS et al., 2009).

Nas três últimas décadas, micro-organismos saprófitas incluindo gênero *Corynebacterium* emergiram como patógenos oportunistas relevantes embora permaneçam negligenciados e sendo descartados como meros contaminantes. Este gênero desperta especial interesse por sua alta incidência, potencial patogênico e multirresistência a antimicrobianos. Os grupos de risco englobam pacientes debilitados, imunocomprometidos, portadores de dispositivos médicos invasivos, submetidos a longos períodos de internação hospitalar, antibioticoterapia prolongada e neoplasias (CARVALHO et al., 2018; WILLIAM et al., 2016; MALINI SHARIFF, et al., 2018; QIN et al., 2017).

Procedimentos invasivos e cirúrgicos realizados no ambiente hospitalar podem contribuir para as IRAS. Apesar do uso de procedimentos de esterilização e do desenvolvimento de técnicas de assepsia mais avançadas, as infecções associadas a dispositivos hospitalares ainda representam um grave problema relacionado, com a o crescente aparecimento de patógenos emergentes incluindo as resistentes aos medicamentos (RENOM et al., 2007). Os biofilmes formados por microorganismos patogênicos nestes materiais presentes em

ambientes de assistência a saúde, tornado-se uma via facilitada ao sistema hematogênico do paciente. Adicionalmente, infecções associadas a procedimentos invasivos, diretamente relacionadas a limpeza e desinfecção de alto nível de forma inadequadas, pode corroborar para a persistência e disseminação de agentes infecciosos (ALFA et al., 2008; CARVALHO et al., 2018; SOUZA et al., 2015).

As áreas hospitalares subdividem-se conforme os riscos em: (i) CRÍTICAS - são aquelas onde há maior número de pacientes graves com sistema imunológico deprimido, maior número de procedimentos invasivos, em consequência, maior risco de infecções, ex.: Centro Cirúrgico, CTI, Centro de esterilização, Hemodiálise, Lactário, CTQ, Necrotério, Laboratório, Expurgo; (ii) SEMI-CRÍTICAS - são aquelas onde se encontram pacientes internados e o risco de infecção é menor. ex.: Enfermarias, Quartos, Ambulâncias, Ambulatórios; (iii) NÃO CRÍTICAS - Todos os setores onde não há risco de transmissão de infecção, não existem pacientes. ex.: Sala do médico, Farmácia, Auditório, Administração, Refeitório, Centro de estudos, pátios, jardins, etc. (RUTALA,1996).

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 de agentes infecciosos está diretamente relacionada com a maneira incorreta de reaproveitar os materiais de fins cirúrgicos, tão comuns nestes ambientes (HOWIE; ALFA, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Infecções relacionadas a assistência a saúde IRAS causadas por BGPIs vêm adquirindo crescente importância tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento. As IRAS representam um agravamento de grande significado epidemiológico, tanto no contexto da saúde pública quanto no atendimento hospitalar.

C. striatum apresenta-se como um patógeno emergente perigoso capaz de causar IRAS, incluindo surtos nosocomiais. Diferentes países associam *C. striatum* a infecções graves, como bacteremia, septicemia, meningite e endocardite, sobretudo em indivíduos admitidos em centros de terapia intensiva submetidos a procedimentos, tais como cateterização e intubação endotraqueal.

Habilidades como formar biofilmes em diversas superfícies que constituem a maioria dos artigos utilizados no ambiente hospitalar, seu perfil de resistência e/ou tolerância a múltiplas drogas, dificuldade de identificação e escassez de estudos sobre aspectos relativos a seus fatores de virulência podem estar favorecendo o estabelecimento e disseminação em ambiente hospitalar, torna *C. striatum* um patógeno perigoso. Desta forma, novos estudos esclarecendo características fenotípicas e moleculares permanecem necessários para o conhecimento e consequentemente adoção de medidas eficientes para o correto isolamento, diagnóstico e erradicação de *C. striatum*

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar aspectos de vigilância epidemiológica, além de fatores fenotípicos e moleculares relacionados à possível expressão de virulência pela espécie *C. striatum* capazes de favorecer a persistência e disseminação de infecções nosocomiais severas, por vezes fatais, em pacientes internados submetidos a procedimentos invasivos, incluindo uso de cateteres endovenosos e tubos endotraqueais, através de ensaios *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Confirmar, pelas técnicas de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e sequenciamento de genes conservados (rpoB e 16S rRNA), amostras bacterianas encaminhadas pelo LABAC/HUPE entre 2009 e 2018, identificadas através de testes bioquímicos convencionais, pelo LDCIC como *C. striatum*;
- b) Realizar a vigilância epidemiológica (2009 a 2018) de amostras de *C. striatum* inicialmente detectadas em surto isoladas em diferentes sítios de infecção e setores de Hospital Universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro;
- c) Determinar os perfis de susceptibilidade das amostras de *C. striatum* aos diferentes grupos de agentes antimicrobianos pela técnica de disco-difusão em ágar;
- d) Determinar os perfis clonais das amostras clínicas e/ou de ambientes e superfícies pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE);
- e) Avaliar, qualitativa e quantitativamente, a capacidade de formação de biofilme de *C. striatum* em diversos substratos abióticos de natureza hidrofílica (vidro, fragmentos de poliuretano e metal cirúrgico) e hidrofóbica (poliestireno);
- f) Avaliar o comportamento da atividade de formas sésseis de *C. striatum* em diversas superfícies inertes abióticas de na presença de proteínas de matriz e de plasma humano como fibrinogênio e outros;

- g) Avaliar a susceptibilidade do biofilme formado por *C. striatum*, em diferentes substratos, aos agentes biocidas de uso hospitalar;
- h) Avaliar a susceptibilidade de formas planctônicas de *C. striatum* a principais biocidas utilizados em ambientes hospitalares pela técnica *Time Kill*;
- i) Avaliar o comportamento de *C. striatum* quanto à formação do biofilme, alterações hematológicas e morfológicas através de ensaios *in vivo* utilizando camundongos e o nematoide *C. elegans*;
- j) Analisar morfológicamente o biofilme produzido *in vivo* e *in vitro* por *C. striatum* pela técnica de microscopia eletrônica de varredura;
- k) Investigar, através da técnica de PCR, a presença de genes de resistência: *ermX* (macrolídeos) *tetA* (tetraciclina), *cmxB* (cloranfenicol), *aphA1*(amino glicosídeos) e relacionados à expressão de fímbrias *spaA*, *spaD* e *spaF* no genoma das amostras de *C. striatum*;
- l) Sequenciar parcialmente o genoma da amostra MDS *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 isolada de urina.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos permitiram a publicação e/ou submissão de 05 artigos científicos em periódicos qualificados pela CAPES abaixo relacionados, além de possibilitar resultados para 02 artigos, os quais estão em fase de redação e mais 05 artigos em fases de construção que estão apresentados no Apêndice I.

1 - **Souza C, Faria YV, Sant'anna LO, Viana VG, Seabra SH, Souza MC, Vieira VV, Hirata JrR, Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL.** (2015) Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. Mem Inst Oswaldo Cruz.; 110(2): 242-248. (Qualis A2)

2 - **Ramos JN, Souza C, Faria YV, Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, Seabra SH, Moreira LO, Santos CS, Mattos-Guaraldi AL, Vieira VV.** (2019) Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. : BMC Infectious Diseases (Qualis A2)

3 - **Ana L. Mattos-Guaraldi, Luis C. Guimarães, Carolina S. Santos, Adonney A. O. Veras, Adriana R. Carneiro, Siomar C. Soares, Juliana N. Ramos, Cassius Souza, Veronica V. Vieira, Raphael Hirata Jr, Vasco Azevedo, Luis G. C. Pacheco, Artur Silva, Rommel T. J. Ramos** (2015). Draft Genome Sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09 a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the Urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient.; *Genome Announc* 00869-15. (Qualis B3)

4 - **Souza C, Simpson-Louredo L, Mota, HF, Faria YV, Cabral FO, Colodette SS, Castro Canellas MEF, Cucinelli, AES, Graças de Luna M, Santos CS, Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL.** 2019 - Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. (Qualis B1)

5 - **Souza C, Cabral FO, Mota HF, Faria YV, Viana VG, Nagao PE, Santos CS Duarte RS, Moreira LO, Mattos.** Tolerance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum* – *Submetida para Microbial Droug Resistent 2019 em Jun 2019*- (Qualis A4)

4.1 Artigo 1 - Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak (Artigo publicado)

Artigo 1 - Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(2): 242-248.

Autores: Souza C, Faria YV, Sant'anna LO, Viana VG, Seabra SH, Souza MC, Vieira VV, Hirata JrR, Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL. (Qualis A1)

Revista: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2015; 48: 458-64. (Qualis A1)

Resumo

Corynebacterium striatum é um microrganismo potencialmente patogênico e capaz de causar surtos nosocomiais. No entanto, pouco se conhece sobre seus fatores de virulência que podem contribuir para o estabelecimento e disseminação de Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde (IRAS). No presente estudo foi investigada a habilidade de produção de biofilme em superfícies abióticas de amostras de *C. striatum* multirresistentes (MDR) e multisensíveis (MDS) a diferentes agentes antimicrobianos, pertencentes a diferentes pulsos tipos I-MDR, II-MDR, III-MDS e IV-MDS determinados através de gel eletroforese em campo (PFGE), isoladas durante um surto nosocomial no Rio de Janeiro, Brasil. Os resultados demonstraram que *C. striatum* foi capaz de aderir a superfícies abióticas hidrofílicas e hidrofóbicas. A amostra *C. striatum* 1987 / I-MDR, predominantemente isolada de pacientes submetidos a procedimentos de intubação endotraqueal, apresentou maior capacidade de aderência a todas as superfícies testadas. Uma maior produção de biofilme por *C. striatum* foi observada na presença de fibrinogênio. Ensaios de microscopia eletrônica de varredura confirmaram que todos pulsos tipos formaram biofilmes maduros em cateteres de poliuretano. Os dados permitiram concluir que a produção de biofilme pode contribuir para o estabelecimento de IRAS causadas por *C. striatum*.

Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak

Cassius de Souza¹, Yuri Vieira Faria¹, Lincoln de Oliveira Sant'Anna¹, Vanilda Gonçalves Viana¹, Sérgio Henrique Seabra², Mônica Cristina de Souza¹, Verônica Viana Vieira³, Raphael Hirata Júnior¹, Lillian de Oliveira Moreira⁴*, Ana Luíza de Mattos-Guaraldi¹

¹Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Centro Colaborador de Referência e Pesquisa em Difteria/Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Laboratório de Bacteriologia e Imunologia Clínica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corynebacterium striatum is a potentially pathogenic microorganism that causes nosocomial outbreaks. However, little is known about its virulence factors that may contribute to healthcare-associated infections (HAIs). We investigated the biofilm production on abiotic surfaces of multidrug-resistant (MDR) and multidrug-susceptible (MDS) strains of *C. striatum* of pulsed-field gel electrophoresis types I-MDR, II-MDR, III-MDS and IV-MDS isolated during a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. The results showed that *C. striatum* was able to adhere to hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces. The *C. striatum* 1987/I-MDR strain, predominantly isolated from patients undergoing endotracheal intubation procedures, showed the greatest ability to adhere to all surfaces. *C. striatum* bound fibrinogen to its surface, which contributed to biofilm formation. Scanning electron microscopy showed the production of mature biofilms on polyurethane catheters by all pulsotypes. In conclusion, biofilm production may contribute to the establishment of HAIs caused by *C. striatum*.

Key words: biofilm - *Corynebacterium striatum* - epidemic clone - fibrinogen - multi-resistance - nosocomial outbreak

Corynebacterium striatum is an emerging multidrug-resistant (MDR) potentially pathogenic microorganism that causes nosocomial infection in patients who have experienced long hospital admissions, those who have received several courses of antibiotics (Camello et al. 2003, Otsuka et al. 2006, Renom et al. 2007, Baio et al. 2013), those with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) or cancer and those who have received a transplant (Tarr et al. 2003, Martins et al. 2009). Cases of severe infections in both immunocompromised and immunocompetent individuals and nosocomial outbreaks due to MDR *C. striatum* are increasing in both industrialised and developing countries. *C. striatum* has been associated with cases of pulmonary infections, sepsis, endocarditis, meningitis, osteomyelitis, arthritis, sinusitis, skin wounds and intrauterine infections (Rufael & Cohn 1994, Weiss et al. 1996, Fernández-Ayala et al. 2001, Camello et al. 2003, Renom et al. 2007, Scholle 2007, Boltin et al. 2009, Campanile et al. 2009, Martins et al. 2009, Moore et al. 2010, Oliva et al. 2010, Baio et al. 2013).

Genotyping analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has identified PFGE types associated with nosocomial outbreaks of respiratory origin and with resistance to a broad range of antibiotics (MDR phenotype). In Italy, MDR *C. striatum* isolates have been recovered from hospitalised patients who have undergone surgery or have been admitted to intensive care units (ICUs). These isolates have been responsible for cases of ventilator-associated pneumonia and tracheobronchitis, catheter-related sepsis and wound infections. Infections caused by this species have been strongly associated with devices, including not only tubes and catheters, but also sternal surgical wound wires (Campanile et al. 2009). *C. striatum* has also been isolated from other materials for hospital use, such as endotracheal tubes (Martinez-Martinez et al. 1995). Earlier genotype studies have confirmed that *C. striatum* may be transmitted between patients, from person to person and via caretakers (Leonard et al. 1994). Recently, a nosocomial outbreak caused by *C. striatum* was documented in Rio de Janeiro (RJ), Brazil. PFGE analysis indicated the presence of four PFGE profiles, including two related clones of MDR strains (PFGE I and II). The results of these studies demonstrate the predominance of PFGE-type I MDR isolates that are mainly isolated from ICUs and surgical wards. *C. striatum* strains have largely been isolated in pure culture from tracheal aspirates of patients undergoing endotracheal intubation procedures (Baio et al. 2013).

Currently, more than half of the infectious diseases that affect mildly immunocompromised patients involve bacterial species that are commonly encountered in the environment or constitute the body's normal flora, including

doi: 10.1590/0074-02760140373

Financial support: CAPES (E26/101.937/2009), FAPERJ (E26/110.735/2012), CNPq (300236/2010-7), SR-2/UERJ, PNPd-CAPES/MEC (0370088)

* Corresponding author: lillian@pharma.ufrj.br

Received 10 October 2014

Accepted 29 January 2015

TABLE

Origin and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)-types of partially studied *Corynebacterium striatum* strains isolated from patients during a nosocomial outbreak in the metropolitan area, Rio de Janeiro, Brazil used in this study

Strains/year	Gender/ age	Hospital wards	Isolation site	Outcome	Antimicrobial susceptibility patterns	PFGE- types
1987 BR-RJ/09	F/50	Nursery 18	BAL	Death	MDR	I
2369 BR-RJ/09	M/NI	General ICU	TA	Cure	MDR	II
1961 BR-RJ/09	F/37	Infectious diseases	Urine	NI	MDS	III
1954 BR-RJ/09	M/NI	Thoracic MSU	Surgical wound	NI	MDS	IV

BAL: bronchoalveolar lavage; F: female; ICU: intensive care unit; M: male; MDR: multiresistance (≥ 3 types of antimicrobial agents); MDS: multidrug susceptible; MSU: medical surgical unit; NI: not informed; TA: tracheal aspirate;

several corynebacterial species (Martins et al. 2009). Opportunistic pathogens may be endowed with an array of virulence factors that facilitate their ability to survive within host tissues and confer resistance to clearance by host immune mechanisms and antimicrobial killing. The ability to form biofilms may be a prerequisite for the pathogenesis of nosocomial diseases associated (or not) with the use of medical devices (Bonifait et al. 2008). Biofilms have been previously described in *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium urealyticum* and *Corynebacterium jeikeium* (Mattos-Guaraldi & Formiga 1991, Soriano et al. 1993, Mattos-Guaraldi et al. 1999a, b, Olson et al. 2002, Kwazewka et al. 2006, Gomes et al. 2009, 2013, Soriano et al. 2009). Thus, the better recognition and understanding of the biology and virulence potential of *C. striatum* strains may help to effectively prevent infections caused by them. Therefore, we investigated the in vitro capacities for biofilm formation of *C. striatum* strains representative of four different PFGE types isolated during a nosocomial outbreak in RJ (Baio et al. 2013).

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains - Table shows the epidemiological and microbiological features of the partially studied *C. striatum* strains used in this investigation (Baio et al. 2013). *C. striatum* identification was established by *16S rRNA* and *rpoB* gene sequencing. *C. striatum* pulsotypes I and II exhibited MDR profiles showing susceptibility only to vancomycin, linezolid and tetracycline, while *C. striatum* pulsotypes III and IV showed susceptibility to most of the 21 antimicrobial agents tested and resistance only to fosfomicin and ticarcillin/clavulanate. The *C. diphtheriae* CAT5003748 strain was used as a positive control in all experiments (Gomes et al. 2009).

Biofilm formation on hydrophilic surfaces of glass tubes - Microorganisms were inoculated in glass tubes (13 x 100 mm) containing 4 mL of trypticase soy broth (TSB) and incubated at 37°C for 24 h without shaking. The tubes were gently shaken and supernatants with non-adherent bacterial cells were discarded. TSB (4 mL) was then added and the tubes were reincubated at 37°C for 24 h. This procedure was repeated twice. Glass-adherent

bacteria created a confluent coat of cells on the sides of the tube. Quantitative analysis of viable sessile cells was based on previously described methods (Mattos-Guaraldi & Formiga 1991, Dooley et al. 1996).

Quantitative and semiquantitative analyses of biofilm formation on catheter - Polyurethane 16-gauge percutaneous nephrostomy catheters (Intracath; Deseret Pharmaceutical Co, USA) were used for an evaluation of bacterial adherence and biofilm formation on catheter surfaces. Sterile 4-cm segments of polyurethane catheters were immersed in TSB containing 10^6 colony-forming unit (CFU) mL⁻¹ and incubated at 37°C for 24 h (Gomes et al. 2009). Then, quantitative catheter culturing (Dooley et al. 1996) and a semiquantitative roll-plate technique (Maki et al. 1977) were performed using Columbia agar medium supplemented with 5% sheep blood at 37°C for 24 h.

Scanning electron microscopy (SEM) - Sections of glass coverslips and polyurethane catheters were fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated in a graded series of ethanol. Subsequently, catheter segments were subjected to critical point drying with carbon dioxide, covered with a 10 nm layer of gold palladium and examined with a JEOL JSM 5310 scanning electron microscope. Sterile unused polyurethane catheters were also processed by SEM directly upon removal from commercial packaging (Gomes et al. 2009).

Biofilm formation on hydrophobic polystyrene surfaces - Biofilm formation on negatively charged polystyrene surfaces was determined quantitatively in 96-well flat-bottomed microtitre plates according to previously described methods (Stepanovic et al. 2000, Gomes et al. 2009). Aliquots of 200 μ L of bacterial suspensions [0.2 optical density (OD) at $\lambda=570$ nm] were added to the microplate wells. After incubation at 37°C for 24 h, the contents of each well were aspirated and washed three times with 200 μ L phosphate-buffered saline (0.01 M, pH 7.2). The remaining attached bacteria were fixed with 200 μ L of 99% methanol and stained with 2% crystal violet. The negative controls contained TSB only. The bound dye was then solubilised with 160 μ L of 33% glacial acetic acid and the OD of the solution was measured at $\lambda=570$ nm using an enzyme immunosorbent assay reader (BioRad,

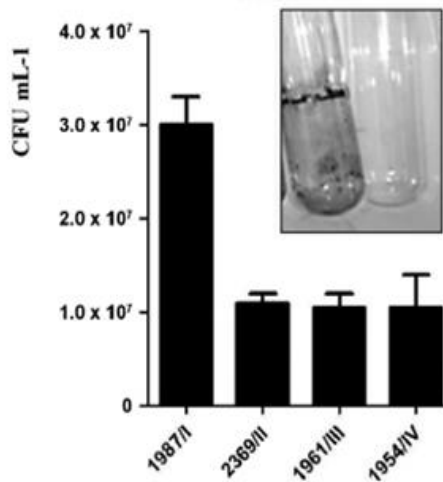


Fig. 1: *Corynebacterium striatum* adherence to glass surfaces (24 h incubation) evaluated by quantitative and semiquantitative tests. In detail, glass tubes with 1987/I strain exhibiting confluent coat of sessile forms on the surface of glass tube wall and with negative control (trypticase soy broth medium without bacteria). CFU: colony-forming unit.

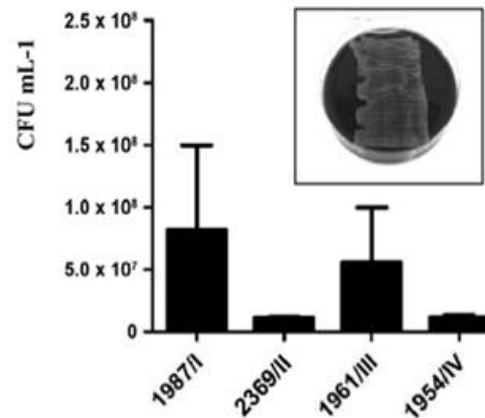


Fig. 2: *Corynebacterium striatum* adherence to polyurethane surfaces evaluated by quantitative and semiquantitative tests. In detail, 1987/I strain infected catheter segment cultured on blood agar plates (roll plate technique). CFU: colony-forming unit.

model 550). The cut-off OD (OD_c) was defined as the mean OD of the negative control. All strains were classified into the following categories based on the ODs of the bacterial films: nonadherent ($0: OD \leq OD_c$) or weakly ($+: OD < OD_c \leq 2 \times OD_c$), moderately ($++: 2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$) or strongly ($+++: 4 \times OD_c \leq OD$) adherent.

Influence of fibrinogen (Fbg) on biofilm formation - Biofilm formation (24 h) was determined in 96-well flat-bottom polystyrene microtitre plates as described above, with some modifications. In these experiments, the wells of the microplates were pre-treated (or not) with human plasmatic Fbg (Sigma Chemical Co, USA) at a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ overnight at 4°C . Fbg-coated wells containing $200 \mu\text{L}$ of TSB medium without bacteria were used as negative controls (Lembke et al. 2006, Gomes et al. 2009).

Statistical analysis - Each experiment was carried out in triplicate and repeated three times. The biofilm formation by each representative pulsotype strain was compared by ANOVA with Tukey's post test. Student's *t* test was used to compare the means of biofilm formation (OD) in the presence of Fbg for each pulsotype and a $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.6 (USA).

RESULTS

Bacterial adherence to hydrophilic surface of glass tube - Successful bacteria may survive in the hospital environment due to their ability to adhere to different substrates. To determine whether *C. striatum* is able to adhere to glass, we quantified the amount of viable sessile forms of bacteria associated with glass. Viable sessile bacterial cells were observed on glass surfaces at 48 h post-incubation with *C. striatum* strains of PFGE types

I, II, III and IV at different levels (Fig. 1). In Fig. 1, a representative side figure illustrates sessile bacteria stained with crystal violet, indicating the formation of a positive slime/biofilm on the glass surface. All strains were able to strongly adhere to the glass surface, however the *C. striatum* 1987/I-MDR strain showed the highest ability to adhere to this hydrophilic abiotic surface ($p < 0.05$).

Biofilm formation on polyurethane catheter surface - The ability to adhere to catheter materials for intravenous use and medical devices inserted into the body are important characteristics of bacteria associated with healthcare-associated infections. To determine whether *C. striatum* is able to adhere and form biofilms on catheter surfaces, segments of polyurethane catheters were colonised in vitro by *C. striatum* 1987/I, 2369/II, 1961/III and 1954/IV strains. The evaluation of the adherence and viability of microorganisms on the polyurethane catheter segments by the semiquantitative roll plate method ($> 1.5 \times 10^6$ CFU) and by quantitative catheter culture assays ($> 1.5 \times 10^6$ CFU) showed that viable *C. striatum* cells were extensively adherent to and multiplied on the polyurethane catheter surface (Fig. 2). In Fig. 2A, the representative side figure illustrates bacterial growth on an agar plate after catheter colonisation, as assessed by the roll-plate technique. Although all strains were able to adhere to the catheter surface, the *C. striatum* 1987/I-MDR strain again exhibited significantly greater adherence ($p < 0.05$) to this abiotic hydrophobic surface compared with the representative strains of pulsotypes II, III and IV.

Morphological aspects of biofilm formation on the surface of polyurethane medical device as evaluated by SEM - After determining that *C. striatum* was able to adhere to glass and catheter surfaces, forming a visible biofilm, the morphological aspects of the biofilm were inves-

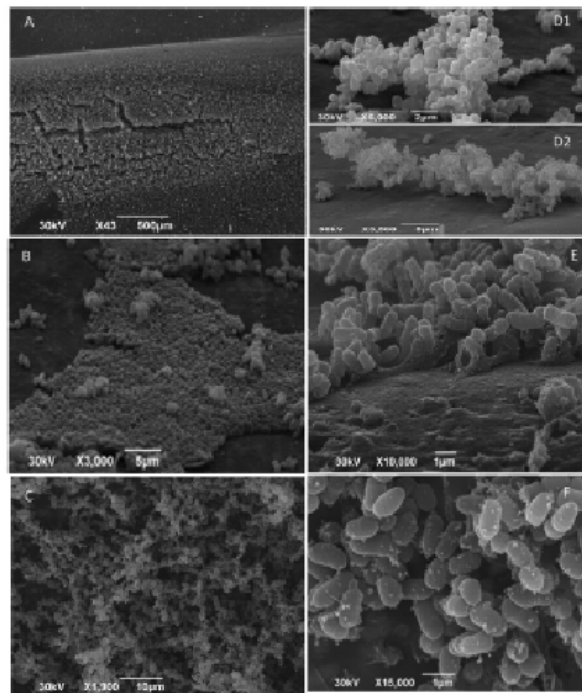


Fig. 3: scanning electron micrographs illustrating biofilm formation on polyurethane catheter surfaces after 24 h incubation with different *Corynebacterium striatum* strains. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)-types I-IV: A, C, F: 1987/I; B, E: 2369/II; D1: 1961/III; D2: 1954/IV; A-C: a large amount of biofilm material exhibiting; B, D: bacterial microcolonies; E: amorphous material on the catheter surface is evident; C, F: presence of hollow voids indicative of mature biofilm formation on surfaces of polyurethane catheters.

tingated by SEM. SEM assay confirmed that all *C. striatum* strains were able to colonise the polyurethane catheter and form mature biofilms (Fig. 3). Fig. 3A-C shows the large amount of biofilm material that was observed. Bacterial microcolonies were present (Fig. 3B, D) and amorphous material on the catheter surface was evident (Fig. 3E). In addition, hollow voids were present (Fig. 3C, F). The presence of autoaggregative microcolonies, extracellular slime and hollow voids on the polyurethane surface were all indicative of mature biofilm structure.

Bacterial adherence to hydrophobic polystyrene surface and influence of Fbg on biofilm formation - In addition to glass and catheter surfaces, we also investigated the ability of *C. striatum* to adhere to plastic using negatively charged polystyrene 96-well flat-bottom microtitre plates. The quantification of biofilm revealed that all *C. striatum* strains of PFGE types I, II, III and IV were able to adhere to the negatively charged plastic (polystyrene) surface at different intensities (Fig. 4). Again, the *C. striatum* 1987/I-MDR strain exhibited a significantly ($p < 0.05$) greater level of adherence to

this abiotic hydrophobic surface compared with the *C. striatum* 2369/II-MDR, 1961/III-multidrug-susceptible (MDS) and 1954/IV-MDS strains.

Several microorganisms use extracellular matrix proteins, such as Fbg, to increase their ability to interact with different cells and also with abiotic surfaces. To investigate the influence of Fbg on the ability of *C. striatum* to adhere to plastic microtitre plates, plates were pre-treated with human plasmatic Fbg prior to bacterial colonisation. As shown in Fig. 4, human Fbg enhanced biofilm formation on the polystyrene surfaces by the *C. striatum* 1987/I-MDR ($p = 0.00362$), 2369/II-MDR ($p = 0.0022$) and 1961/III-MDS ($p = 0.0105$) strains, suggesting that this matrix protein may contribute to the interaction of different clones of this human pathogen with abiotic hydrophobic surfaces.

DISCUSSION

Bacterial biofilms form in association with many human activities, including food processing, transportation, public infrastructure and, most importantly, healthcare (Rzhapishevska et al. 2013). Biofilms have been found on

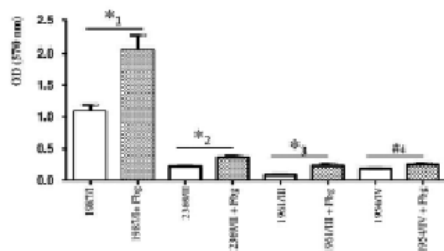


Fig. 4: biofilm formation (24 h incubation) on polystyrene surface by *Corynebacterium striatum* strains evaluated by a semi-quantitative microplate assay. Effect of human plasma fibrinogen (Fbg) on biofilm formation by representative strains of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)-types I-IV. Experiments were performed in triplicate and the means standard deviations of three independent experiments. *: $p < 0.05$; #: $p > 0.05$.

numerous medical devices (e.g., urinary catheters, central venous catheters and endoscopes). Their presence can have serious implications for immunocompromised patients and those with indwelling medical devices (Brown & Williams 1985, Russell & Russell 1995, Rutala et al. 2008, Al Akhrass et al. 2012). The acquisition of the ability to form biofilms may represent a good strategy for a microorganism to acquire enhanced survival under conditions of stress, e.g., during host invasion or following antibiotic treatment, because cells growing in biofilms are highly resistant to components of the human immune system and to numerous types of antimicrobial agents. In addition, the ability of bacterial cells to transfer genes horizontally is enhanced within biofilm communities, thereby facilitating the spread of antibiotic resistance (Stewart & Costerton 2001, Lee et al. 2008).

Our results reveal the capacities of diverse *C. striatum* isolates to adhere to various abiotic surfaces and to form biofilms in an in vitro catheter model. The data revealed variations among the capacities of diverse clones of MDR and MDS *C. striatum* strains identified during a nosocomial outbreak in RJ to adhere to and survive on positively and negatively charged abiotic surfaces. Notably, we identified an association of increased biofilm formation, antimicrobial multiresistance and clonality of the *C. striatum* strains. In the present study, *C. striatum* MDR PFGE types I and II were predominantly isolated during the nosocomial outbreak from in-patients undergoing endotracheal intubation procedures in the ICU or in surgical wards. The clinical isolates of these PFGE types expressed a high capacity to form biofilms on hydrophilic (glass; positively charged) and hydrophobic (polystyrene; negatively charged) abiotic surfaces, including polyurethane (positively charged) catheter surfaces.

The *C. striatum* strains showed properties similar to other pathogenic biofilm producers. The results of the semi-quantitative roll-plate method and quantitative catheter culture assays showed that viable bacterial cells

extensively adhered to and multiplied on the surfaces of polyurethane catheters. SEM revealed a large amount of biofilm on polyurethane catheter surfaces produced by all *C. striatum* strains tested.

The developmental biology of biofilm formation can be characterized into three stages: initial attachment, development of microcolony formation and detachment (O'Toole et al. 2000). Similar to *C. diphtheriae* (Gomes et al. 2013), *Acinetobacter baumannii* (Rao et al. 2008) and other nondiphtherial *Corynebacterium* species (Soriano et al. 1993, Gomes et al. 2009), autoaggregative *C. striatum* strains were able to attach to and form microcolonies (a hallmark of biofilm formation) on abiotic surfaces. *C. striatum* also formed matrix-enclosed microcolonies on in vitro colonized polyurethane surfaces. Hollow voids indicative of mature biofilm formation on the surfaces of polyurethane catheters were also observed. The formation of hollow voids seems to be involved in the dispersion of sessile bacterial cells during the final stage of biofilm formation, which can increase bacterial virulence (Kice et al. 2009).

Some bacterial properties are associated with biofilm production, including the increased synthesis of exopolysaccharides, hydrophobic properties and the development of antibiotic resistance (Olson et al. 2002, Costerton et al. 2003, Rao et al. 2008). A previous study has addressed the prevention of biofilms and has shown that the surface charge of an abiotic substrate may influence the morphology and physiology of a biofilm (Rzepishevska et al. 2013). In the present study, the MDR and MDS *C. striatum* strains were able to adhere at different levels to negatively charged plastic (polystyrene) and positively charged (glass) surfaces, as previously observed with *C. diphtheriae* and/or *C. urealyticum* (Mattos-Guaraldi & Formiga 1991, Mattos-Guaraldi et al. 1999a, b, Soriano et al. 2009, Gomes et al. 2013). Polyurethane implanted subcutaneously into mice led to an infiltration of erythrocytes and subsequent haemolysis, possibly due to the attraction of this positively charged plastic to negatively charged cells (Rigdon 1970). In accordance with previous observations of *C. diphtheriae* (Mattos-Guaraldi & Formiga 1991, Mattos-Guaraldi et al. 1999a, b, Gomes et al. 2013), the negatively charged cell surfaces of *C. striatum* strains and their adherence to polyurethane may be partially explained by the positive electric charge associated with this polymer. Moreover, the amorphous deposited substances or glycocalyx noted surrounding *C. striatum* microcolonies on the surfaces of the polyurethane catheters suggest that this bacteria may produce or attract substances that strengthen their attachment to inert surfaces in vitro.

Hydrophobicity has been significantly associated with biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria on solid surfaces (Kwaszewska et al. 2006). For *C. diphtheriae* strains, bacterial autoaggregation and hydrophobicity are mainly related to biofilm formation on polystyrene surfaces (Mattos-Guaraldi et al. 1999a). The cell surface hydrophobicity of *C. striatum* strains was demonstrated by their ability to adhere to polystyrene surfaces. Therefore, *C. striatum* strains should be included among bacterial species that have a natural tendency to adhere to available biotic and/or abiotic surfaces and to

form biofilm (Olson et al. 2002, Kwaszewska et al. 2006, Soriano et al. 2009) and that are also capable of rapid physiological responses following exposure to surfaces with varying physicochemical characteristics, enabling some bacterial colonisation on negatively charged surfaces (Kwaszewska et al. 2006).

In natural environments, bacteria typically adhere to the layer of adsorbed molecules that coats inert surfaces, the so-called "conditioning film" and not directly to the substratum. In vivo, any material surface is rapidly covered by plasma and matrix proteins, to which bacteria may display specific adhesins. The stimulation of bacterial biofilm formation by exogenous mammalian proteins has been reported for many human pathogens (Bonifait et al. 2008, Gomes et al. 2009, 2013). Fbg is a major protein in human plasma and is primarily involved in the coagulation cascade system through its conversion to insoluble fibrin. Fbg synthesis is dramatically upregulated during inflammation or under stress conditions, such as systemic infections. Fbg and fibrin play overlapping roles in blood clotting, fibrinolysis, the inflammatory response, cellular and matrix interactions and wound healing (Mosesson 2005). The Fbg binding properties of *Staphylococcus aureus* (O'Neill et al. 2008), *Streptococcus suis* (Bonifait et al. 2008) and *C. diphtheriae* (Gomes et al. 2009, Sabbadini et al. 2010) allow them to attach to each other through Fbg-mediated cross-bridging, contributing to biofilm production. The ability of *C. striatum* strains to bind to Fbg was also demonstrated in the present study. In addition to the ability to form biofilms directly on hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces, *C. striatum* also produced biofilms on Fbg-associated "conditioning films". Compared with the formation of biofilms on the uncoated polystyrene surfaces, the Fbg-coated surfaces showed enhanced biofilm formation by the *C. striatum* 1987I-MDR strain, which was responsible for a previous nosocomial outbreak. The enhancement occurred at a typical in vivo concentration of Fbg in blood plasma of approximately 2.5 mg/mL. Therefore, the expression of Fbg-binding adhesins at different levels may be implicated in biofilm formation on "conditioning films" by *C. striatum* strains, as has been previously reported for *S. suis* (Bonifait et al. 2008).

In conclusion, *C. striatum* may form biofilms in vivo by an adherent biofilm mode of growth in vitro, as was demonstrated on hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces, including polyurethane catheters. The affinity of *C. striatum* for human Fbg was determined to be an additional potential virulence trait of this organism. In addition to its multi-resistance to antimicrobial agents used in therapy, the ability to produce a "conditioning film" may contribute to the establishment and dissemination of nosocomial infections caused by this organism, including those in patients with indwelling medical devices.

Thus, *C. striatum* strains capable of forming biofilms may be selected under antibiotic pressure, or conversely, *C. striatum* may acquire resistance to multiple drugs within biofilm communities. In either event, the high colonising capacity of *C. striatum* combined with its resistance to multiple drugs will contribute to the survival and further dissemination of this organism in the hospital setting.

REFERENCES

- Al Akhrass F, Al Woboush I, Chaftari AM, Reitzel R, Jiang Y, Ghanoun M, Tarrand J, Hachem R, Raad I 2012. *Rhodococcus* bacteremia in cancer patients is mostly catheter related and associated with biofilm formation. *PLoS ONE* 7: e32945.
- Baio PVP, Mota HF, Freitas AD, Gomes DLR, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TCF, Hirata Jr R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL 2013. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 23-29.
- Boltin D, Katzir M, Bugoslavsky V, Yalashvili I, Brosh-Nissimov T, Fried M, Elkayam O 2009. *Corynebacterium striatum* - a classic pathogen eluding diagnosis. *Eur J Intern Med* 20: 49-52.
- Bonifait L, Grignon L, Grenier D 2008. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 74: 4969-4972.
- Brown MRW, Williams P 1985. The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Annu Rev Microbiol* 39: 527-556.
- Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA 2003. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol* 34: 39-44.
- Campanile F, Carretto E, Barbarini D, Grigis A, Falcone M, Goglio A, Venditti M, Stefani S 2009. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg Infect Dis* 15: 75-78.
- Costerton JW, Veoh R, Shirtliff M 2003. The application of biofilm science to the study of and control of chronic bacterial infections. *J Clin Inv* 112: 1446-1477.
- Dooley DP, Garcia A, Kelly JW, Longfield RN, Harrison L 1996. Validation of catheter semiquantitative culture technique for non-staphylococcal organisms. *J Clin Microbiol* 34: 409-412.
- Fernández-Ayala M, Nan DN, Fariñas MC 2001. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. *Am J Med* 111: 167.
- Gomes DL, Martins CA, Faria LM, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, Souza MC, Alves GB, Rosa AC, Nagao PE, Pereira GA, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL 2009. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol* 58: 1419-1427.
- Gomes DL, Peixoto RS, Barbosa EA, Napoleão F, Sabbadini PS, dos Santos KR, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Jr R 2013. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J Med Microbiol* 62: 754-760.
- Kwaszewska AK, Brewczyńska A, Szewczyk EM 2006. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. *Pol J Microbiol* 55: 189-193.
- Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 14: 49-54.
- Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B 2006. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environ Microbiol* 72: 2864-2875.
- Leonard RB, Nowowiejski DJ, Warren JJ, Finn DJ, Coyle MB 1994. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. *J Clin Microbiol* 32:164-169.

- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW 1977. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 296: 1305-1309.
- Martinez-Martinez L, Suarez AI, Winstanley J, Ortega MC, Bernard K 1995. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. *J Clin Microbiol* 33: 2458-2461.
- Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E, Hirata Jr R, Thuler LCS, Mattos-Guaraldi AL 2009. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 905-913.
- Mattos-Guaraldi AL, Cappelli EA, Previato JO, Formiga LC, Andrade AF 1999a. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. *FEMS Microbiol Lett* 170: 159-166.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC 1991. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Braz J Med Biol Res* 24: 399-406.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC, Andrade AF 1999b. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol* 38: 37-42.
- Moore K, Hall V, Paull A, Morris T, Brown S, McCulloch D, Richardson MC, Harding KG 2010. Surface bacteriology of venous leg ulcers and healing outcome. *J Clin Pathol* 63: 830-834.
- Mosesson MW 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3: 1894-1904.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49-79.
- Oliva A, Belvisi V, Iannetta M, Andreoni C, Mascellino MT, Lichtner M, Vullo V, Mastroianni CM 2010. Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. *J Clin Microbiol* 48: 4669-4671.
- Olson ME, Ceri H, Moreck DW, Buret AG, Read RR 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66: 86-92.
- O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* 190: 3835-3850.
- Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Ezaki T, Kimura S 2006. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54: 109-114.
- Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K 2008. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 26: 333-337.
- Renom F, Garau M, Rubí M, Ramis F, Galmés A, Soriano JB 2007. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 45: 2064-2067.
- Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M, Hauser A, McDougald D, Webb JS, Kjelleberg S 2009. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J* 3: 271-282.
- Rigdon RH 1970. Hemolysis associated with plastics - A histopathologic study with polyurethane. *J Biomed Mater Res* 4: 57-71.
- Rufael DW, Cohn SE 1994. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review. *Clin Infect Dis* 19: 1054-1061.
- Russell AD, Russell NJ 1995. Biocides: activity, action and resistance. *Symp Soc Gen Microbiol* 53: 327-365.
- Rutala WA, Weber DJ, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) 2008. *Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008*, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 158 pp.
- Rzhepishevska O, Hakobyan S, Ruhel R, Gautrot J, Barberoc D, Ramstedt M 2013. The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture. *Biomater Sci* 1: 589-602.
- Sabbadini PS, Genovez MRN, da Silva CF, Adelino TLN, dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Dias AASO, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Jr R 2010. Fibrinogen binds to nontoxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 706-711.
- Scholle DA 2007. Spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum*. *J Clin Microbiol* 45: 656-658.
- Soriano F, Huelves L, Naves P, Rodriguez-Cerrato V, del Prado G, Ruiz V, Ponte C 2009. In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *J Antimicrob Chemother* 63: 353-356.
- Soriano F, Ponte C, Galiano MJ 1993. Adherence of *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2) and *Corynebacterium jeikeium* to intravascular and urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 453-456.
- Stepanovic S, Vukovic D, Davic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microb Meth* 40: 175-179.
- Stewart PS, Costerton JW 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
- Tarr PE, Stock F, Cooke RH, Fedorko DP, Lucey DR 2003. Multidrug resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transplant Infect Dis* 5: 53-58.
- Weiss K, Labbé AC, Laverdière M 1996. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clin Infect Dis* 23: 1246-1248.

4.2 Artigo 2 - Draft Genome Sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09, a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the Urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient (Artigo publicado)

Artigo 2 - Draft Genome Sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09, a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the Urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient

Autores: Ana L. Mattos-Guaraldi, Luis C. Guimarães, Carolina S. Santos, Adonney A. O. Veras, Adriana R. Carneiro, Siomar C. Soares, Juliana N. Ramos, Cassius Souza, Veronica V. Vieira, Raphael Hirata, Jr, Vasco Azevedo, Luis G. C. Pacheco, Artur Silva, Rommel T. J. Ramos (Qualis B3)

Revista: *Genome Announcements* 2015; Volume 3 Issue 4 e 00869-15. (Qualis B3)

Resumo

Corynebacterium striatum, descrito como um componente da microbiota anfibiótica normal de tecido cutâneo e de nasofaringe humana, também é potencialmente patogênico, sendo identificado como agente etiológico de diferentes tipos de infecções nosocomiais. O presente estudo descreve o sequenciamento parcial do genoma da amostra *C. striatum* 1961 BR-RJ/09, isolada de urina de paciente hospitalizado no Brasil.

Draft Genome Sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09, a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the Urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient

Ana L. Mattos-Guaraldi,^a Luis C. Guimarães,^b Carolina S. Santos,^c Adonney A. O. Veras,^b Adriana R. Carneiro,^b Siomar C. Soares,^d Juliana N. Ramos,^{a,e} Cassius Souza,^a Veronica V. Vieira,^f Raphael Hirata, Jr.,^a Vasco Azevedo,^g Luis G. C. Pacheco,^c Artur Silva,^b Rommel T. J. Ramos^b

Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^a; Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil^b; Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil^c; Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Institute of Biological Sciences and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil^d; National Institute for Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation (INCCQS-Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^e; Instituto Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Foundation (IOC-Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^f; Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil^g

A.S. and R.T.J.R. contributed equally to this work.

Corynebacterium striatum commonly colonizes the normal skin and nasopharyngeal tract of humans; however, this potentially pathogenic bacterium has been identified as the causative agent of several nosocomial infections. The current study describes the draft genome of strain 1961 BR-RJ/09, isolated from the urine of a hospitalized patient from Brazil.

Received 25 June 2015 Accepted 29 June 2015 Published 6 August 2015

Citation Mattos-Guaraldi AL, Guimarães LC, Santos CS, Veras AAO, Carneiro AR, Soares SC, Ramos JN, Souza C, Vieira VV, Hirata R, Jr, Azevedo V, Pacheco LG, Silva A, Ramos RTJ. 2015. Draft genome sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09, a multidrug-susceptible strain isolated from the urine of a hospitalized 37-year-old female patient. *Genome Announc* 3(4):e00869-15. doi:10.1128/genomeA.00869-15.

Copyright © 2015 Mattos-Guaraldi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Ana L. Mattos-Guaraldi, aguaraldi@gmail.com, or Rommel T. J. Ramos, rommelthiago@gmail.com.

Corynebacterium striatum is a Gram-positive bacterium that belongs to the CMNR group, which includes species of the genera *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Noctuidia*, and *Rhodococcus* (1). Pathogenic clones of *C. striatum*, mostly causing respiratory tract infections, have been identified in several nosocomial outbreaks reported in different countries (2–4). This microorganism has also been reported to be responsible for infections that include endocarditis, meningitis, and septic arthritis (2, 5). Many isolates of this emerging human pathogen already present a multidrug-resistant phenotype.

A recent study in Brazil (6) evaluated the antimicrobial susceptibility patterns of several *C. striatum* isolates recovered from hospitalized patients and, through pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, identified clones associated with outbreaks and with multidrug resistance. In this context, the *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 strain (PFGE type III, multidrug susceptible) was isolated from the urine of a hospitalized 37-year-old woman from Rio de Janeiro, Brazil (6). Genomic DNA of this isolate was extracted using the QIAamp DNA minikit (Qiagen) protocol, and genome sequencing was performed using an Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) System with a 318 chip and fragment libraries. The quality of reads was analyzed using the software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) and the *de novo* assembly was performed using MIRA v4.02 (7) and SPAdes v3.10 (8) assemblers, and curation to reduce the gaps was done with the Lasergene v11 Suite (DNASTar). The assembly produced 28 contigs with a total of 2,611,976 bp and 59.4% G+C content. The contigs were annotated using Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (9), which

identified 2,455 protein-encoding genes and 68 RNA genes. Among the annotated protein-encoding genes, a *markHJI* gene cluster was identified with high similarity to the *Corynebacterium diphtheriae* narKGHJI operon, which is responsible for nitrate reductase (10), suggesting a similar anaerobic growth mechanism. This genome is part of an ongoing study of the comparative genomics, pathogenicity, and vaccine and drug targets of the species.

Nucleotide sequence accession number. This genome has been deposited in GenBank under the accession number LAYR00000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian Research Funding Agencies CNPq, CAPES (PROCAD 071/2013), and FAPESP (JCB0031/2013).

REFERENCES

- Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 37:201–218. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2005056>.
- Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Carmello TC, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL. 2013. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:23–29.
- Renom F, Gomila M, Garau M, Gallegos MD, Guerrero D, Lalucat J, Soriano JB. 2014. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New Microbes New Infect* 2:106–114. <http://dx.doi.org/10.1002/nmi2.48>.
- Verroken A, Baurat C, Deplano A, Bogseris P, Huang D, Wauters G, Glupczynski Y. 2014. Epidemiological investigation of a nosocomial out-

- break of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clin Microbiol Infect* 20:44–50. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12197>.
- Bernard K. 2012. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol* 50:3152–3158. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00796-12>.
 - Souza Cd, Farfa YV, Sant'Anna LdeO, Viana VG, Seabra SH, Souza MC, Vieira VV, Hirata Júnior R, Moreira LdeO, Mattos-Guaraldi AL. 2015. Biofilm production by multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110: 242–248.
 - Chevreur B, Wetter T, Suhai S. 1999. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information, p 45–56. *In* Proceedings of the German Conference on Bioinformatics, GCB '99, October 4–6, Hannover, Germany.
 - Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lestn VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibetki AD, Pyskhin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
 - Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formisano K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
 - Trost E, Blom J, Soares SdC, Huang L-H, Al-Dilaini A, Schröder J, Jaenicke S, Doretta FA, Rocha FS, Miyoshi A, Azevedo V, Schneider MP, Silva A, Camello TC, Sabbadini PS, Santos CS, Santos LS, Hirata R, Mattos-Guaraldi AL, Ebitration A, Schmitt MP, Ton-That H, Tanch A. 2012. 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* 194: 3199–3215. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00183-12>.

4.3 Artigo 3 –Virulence potential of *Corynebacterium striatum* toward *Caenorhabditis elegans* (Artigo publicado)

Artigo 3 –Virulence potential of *Corynebacterium striatum* toward *Caenorhabditis elegans*

Autores: Cassius de Souza, Liliane Simpson Louredo, Higor Franceschi Mota, Yuri FariaVieira, Fellipe Cabral de Oliveira, Sabrina Colodette dos Santos, Maria E. Freire Castro Canellas, Andrezza do Espirito Santo Cucinelli, Maria das Graças de Luna, Cintia da Silva Santos, Raphael Hirata Junior, Ana Luíza Mattos-Guaraldi. (Qualis A1)

Revista: *Antonie Van Leeuwenhoek* 2019; 48: 458-64. (Qualis B1)

Resumo

Na literatura tem sido crescente o número de casos que descrevem *Corynebacterium striatum* como agente etiológico de infecções severas e surtos nosocomiais em países em desenvolvimento e industrializados. Entretanto, até o presente momento foram realizados poucos estudos que investigaram o potencial de virulência de *C. striatum*. Atualmente um modelo de interação patógeno hospedeiro realizado com nematoídeos *Caenorhabditis elegans* tem sido utilizado para investigar o potencial de virulência de bactérias patogênicas, incluindo as corinebactérias. No presente estudo, foram analisadas alterações morfológicas, quimiotaxia e mortalidade de nematoídeos infectados com quatro amostras de *C. striatum* obtidas de diferentes sítios de isolamento, perfis de multirresistência aos agentes antimicrobianos (MDR) e pulso-tipos (PFGE). Os resultados demonstraram locomoção orientada e direcional dos nematoídeos para *C. striatum*. A consequente mortalidade de nematoídeos (60%) foi detectada no primeiro dia pós-infecção com todas as amostras testadas em diferentes intensidades, independente da capacidade de formação de biofilme na superfície de cateteres de poliuretano, temperatura de crescimento dos nematoídeos (20 °C) e mamíferos (37 °C). A amostra *C. striatum* 2369/II (MDR; isolada de aspirado traqueal de um paciente submetido a intubação endotraqueal) e 1961/III (MDS; urina) causaram 100% de mortalidade dos vermes. A sobrevivência dos nematoídeos foi observada até 4 dias pós-infecção com as amostras *C. striatum* MDS 1954/IV (ferida cirúrgica; 13%) e MDR 1987/I (trato respiratório inferior; 39%). O fenótipo Dar foi observado pós-infecção com todas as amostras MDS e MDR, exceto 1954/IV (MDS). A capacidade de formação de bagging foi detectada em 100% das amostras, enquanto a formação de estrelas foi observada apenas com as mesmas amostras que causaram à morte de 100% dos nematódeos. Os resultados permitiram concluir que *C. striatum* apresenta potencial de virulência quando utilizado o modelo de interação patógeno hospedeiro com *C. elegans*. Alterações morfológicas nos nematódeos e diferentes de mortalidade indicam diferenças no potencial de virulência de *C. striatum* independente do local de isolamento clínico, capacidade de formação de biofilme e perfis de MDR e PFGE.



Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*

Cassius de Souza · Liliane Simpson-Louredo · Higor Franceschi Mota · Yuri Vieira Faria · Fellipe de Oliveira Cabral · Sabrina dos Santos Colodette · Maria E. Freire Castro Canellas · Andrezza do Espirito Santo Cucinelli · Maria das Graças de Luna · Cintia da Silva Santos · LÍlian de Oliveira Moreira · Ana Luíza Mattos-Guaraldi

Received: 29 January 2019 / Accepted: 10 April 2019
 © Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract *Corynebacterium striatum* strains have been increasingly reported as etiological agents of nosocomial infections and outbreaks in industrialized and developing countries. However, there are few studies focused on the virulence potential of *C. striatum*. A growing body of research supports the use of *Caenorhabditis elegans* as a model host for investigating the virulence potential of pathogenic bacteria, including corynebacteria. In the present study, chemotaxis behaviour, mortality, and morphological changes were investigated in nematodes infected by four *C. striatum* strains isolated from different clinical sites, and with different MDR profiles and PFGE types. The results showed chemotaxis of nematodes towards *C. striatum*. Nematode death (> 60%) was detected from the first day post-infection with all strains tested, but at different levels, independent of biofilm formation on catheter surfaces

and differences in growth temperature between nematodes (20 °C) and mammals (37 °C). *C. striatum* 2369/II multidrug-resistant (MDR; from tracheal aspirate of a patient undergoing endotracheal intubation) and 1961/III multidrug-sensitive (MDS; urine) strains led to 100% mortality in worms. Survival of nematodes was observed until 4 days post-infection with the *C. striatum* 1954/IV MDS strain isolated from a surgical wound (13%) and 1987/I MDR strain isolated from a patient with a lower respiratory tract infection (39%). The Dar phenotype was observed post-infection with all MDS and MDR strains except 1954/IV. All strains showed the capacity for bagging formation. Star formation was observed only with strains that led to 100% nematode mortality. In conclusion, *C. striatum* was found to exert virulence for *C. elegans*. Variations in nematode morphological changes and levels of mortality indicate differences in the virulence potential of *C. striatum* independent of

C. Souza · H. F. Mota · Y. V. Faria · F. O. Cabral · S. S. Colodette · M. E. F. C. Canellas · A. E. S. Cucinelli · M. G. Luna · C. S. Santos · A. L. Mattos-Guaraldi (✉)

Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health - FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/ UERJ, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ CEP 20551-030, Brazil
 e-mail: aguaraldi@gmail.com

L. Simpson-Louredo
 National Institute of Control and Quality in Health - Oswaldo Cruz Foundation, INCQS, Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil

L. O. Moreira
 Faculty of Pharmacy of Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, 373 - Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ CEP 21941-170, Brazil

clinical isolation site, capacity for biofilm formation, and MDR and PFGE profiles.

Keywords *Corynebacterium striatum* · PFGE types · *Caenorhabditis elegans* · Virulence and multiresistance

Introduction

Corynebacterium striatum is now included among multidrug-resistant (MDR) pathogens increasingly associated with health-care-associated infections (HAIs) such as sepsis, endocarditis, meningitis, osteomyelitis, surgical wounds, and urinary and pulmonary infections in immunocompromised and immunocompetent patients, including patients using invasive medical devices (Creagh et al. 2000; Fernández-Ayala et al. 2001; Campanile et al. 2009; Oliva et al. 2010; Baio et al. 2013; Hashizume et al. 2016; Masuda et al. 2018). Nosocomial outbreaks have also been reported in industrialized and developing countries, including Brazil (Baio et al. 2013; Campanile et al. 2009). However, there have been few studies focused on the virulence potential of *C. striatum* of different clonal groups and multidrug resistance profiles (Baio et al. 2013). The best-characterized feature of *C. striatum* virulence is its capacity for biofilm formation in vitro on solid abiotic surfaces, including catheters. Production of biofilm acts as a virulence mechanism that may allow some corynebacterial pathogens, including *C. striatum*, to adhere to living and artificial surfaces and to resist host immune factors and antibiotics (Souza et al. 2015). Biofilm formation is not only crucial for adherence to and accumulation on artificial surfaces, but also appears to exert protective effects against antibiotics and the immune system. Biofilm-associated infections of biomaterials are usually difficult to eradicate, even with prolonged antibiotic therapy, and often require removal of the colonized material in order to achieve a cure (Ceri et al. 2001).

The nematode *Caenorhabditis elegans* has been used as a model host to study the pathogenic mechanisms of several Gram-positive and Gram-negative human pathogens, including the potentially toxigenic corynebacterial species *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* (Antunes et al. 2016).

The *C. elegans* model system is based on advantageous properties such as short life span, transparency, genetic tractability, and ease of culture using an *Escherichia coli* diet. Depending on the nematode pathogen, aggregates of worms known as worm-stars or death-stars may be formed, or severe rectal swelling - so-called Dar formation - may be observed. Dar is a *C. elegans* pathology first described as a result of infection by *Microbacterium nematophilum*, a Gram-positive coryneform species fortuitously isolated in contaminated *C. elegans* cultures. Previous studies showed that *M. nematophilum* adheres to the rectal epithelium and post-anal cuticle, where it induces local swelling and constipation that leads to a non-lethal, slow-growth phenotype (Antunes et al. 2016). Some corynebacterial species were also found to colonize *C. elegans* and evoke morphological changes as well as altered movement. *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* induced slow star formation and a severe tail-swelling phenotype 2 days post-infection of worms (Antunes et al. 2016; Hodgkin et al. 2013). Because organisms apportion their resources between growth, maintenance, and reproduction, when resources become limited, the allocation to one process necessitates reduced allocation to others. When starved, *C. elegans* adults retain progeny internally, which then consume the parent body contents, and some of those larvae use the resources to reach the resistant, long-lived dauer stage. Specifically, under certain environmental conditions, adult *C. elegans* will often retain their eggs internally, resulting in a premature form of death (Mosser et al. 2011). This is distinguishable from true age-related death and is generally censored in life span analyses, as the mean life span will appear to be shortened if bagged adults are not appropriately identified. Internal egg hatching in *C. elegans*, or “worm bagging,” is also induced by exposure to bacteria. Therefore, the frequency of worm bagging can be regarded as a reliable population-wide stress reporter (Mosser et al. 2011).

To date, two distinct mechanisms of nematode death associated with intestinal tract colonization have been described: transient infection and persistent infection. In the latter case, brief exposure to some pathogens, such as *Enterococcus faecalis* and *Salmonella enterica*, leads to lethal infection that is associated with bacterial retention and proliferation in the *C. elegans* intestinal tract (Garsin et al. 2001; Aballay et al. 2000). In contrast, *Staphylococcus*

Table 1 Microbiological characteristics of *Corynebacterium striatum* strains used in this study previously isolated from patients of a university hospital located in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil*

Strain/PFGE type*	Clinical site	Antimicrobial resistance profiles	Biofilm on polyurethane catheter (CFU/ml)	
			37 °C	20 °C
1987/I	BAL	MDR	1.4×10^8	3.3×10^8
2369/II	Tracheal aspirate	MDR	1.7×10^7	3.5×10^6
1961/III**	Urine	MDS	1.0×10^8	1.4×10^6
1954/IV	Surgical wound	MDS	1.2×10^5	1.6×10^4

BAL bronchoalveolar lavage; MDR multidrug-resistant; MDS multidrug-susceptible. *Escherichia coli* OP50 was used as control (Antunes et al. 2016); **C. striatum* strains partially studied by Baio et al. (2013) and Souza et al. (2015). **Analysis of complete genome sequencing with GenBank accession number LAYR00000000 (Mattos-Guaraldi et al. 2015)

aureus, typical of those pathogens that cause a transient infection, is completely expelled from the intestinal tract within 2 h of transferring nematodes to another food source (Garsin et al. 2001). Consequently, continuous exposure to *S. aureus* is necessary to achieve maximum worm killing (Garsin et al. 2001). *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* have also shown an ability to colonize the nematode intestinal tract and kill worms (Antunes et al. 2016). Therefore, this mechanism of worm killing by *C. striatum* should also be investigated.

There is a growing body of work demonstrating the utility of using *C. elegans* as a model organism to study host–pathogen interactions, from the standpoint of both the pathogen and the host, for a variety of microbial infections.

To the best of our knowledge, there are no data on the virulence potential of *C. striatum* towards *C. elegans* reported in the literature. In the present study, the susceptibility of the soil nematode *C. elegans* to *C. striatum* of different clonal groups, multidrug resistance profiles, and biofilm formation levels on catheter surfaces was investigated.

Methods

Bacterial strains and growth conditions

C. striatum strains used in this study are listed in Table 1. *C. striatum* strains were grown in Trypticase soy broth (TSB) at 37 °C and stored in TSB medium with 20% glycerol at –80 °C. *E. coli* OP50 was grown

in Luria broth at 37 °C (Hodgkin et al. 2013). If appropriate, kanamycin 50 µg ml⁻¹ or chloramphenicol 25 µg ml⁻¹ was added. *C. elegans* strain (WT) N2 was maintained and propagated on *E. coli* OP50 as previously described (Antunes et al. 2016).

Caenorhabditis elegans infection assay

C. elegans N2 was maintained on agar plates inoculated with *E. coli* strain OP50 for 6–7 days until the worms became starved, as indicated by clumping behaviour (Hodgkin et al. 2013). Subsequently, the nematodes were infected with different *C. striatum* strains, as well as *E. coli* OP50. Infection of L4-stage larval worms was carried out with 20 ml of each bacterial strain (from an overnight culture) on nematode growth medium (NGM) plates at 20 °C or 37 °C for 24 h. Worms were assessed each day following infection, and the dead nematodes were counted and removed every 24 h. Approximately 60 nematodes were used for each strain, and the assays were performed three times. Kaplan–Meier survival analysis was performed, and all statistical analyses were carried out in GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software), with *p* values of less than 0.05 considered significant. Morphological changes in *C. elegans* during interactions between nematodes and bacteria, including deformed anal region (Dar) and internal egg hatching (worm bagging), were inspected by light microscopy (Nikon C-DSD 230) and photographed (Antunes et al. 2016; Hodgkin et al. 2013; Garsin et al. 2001; Aballay et al. 2000).

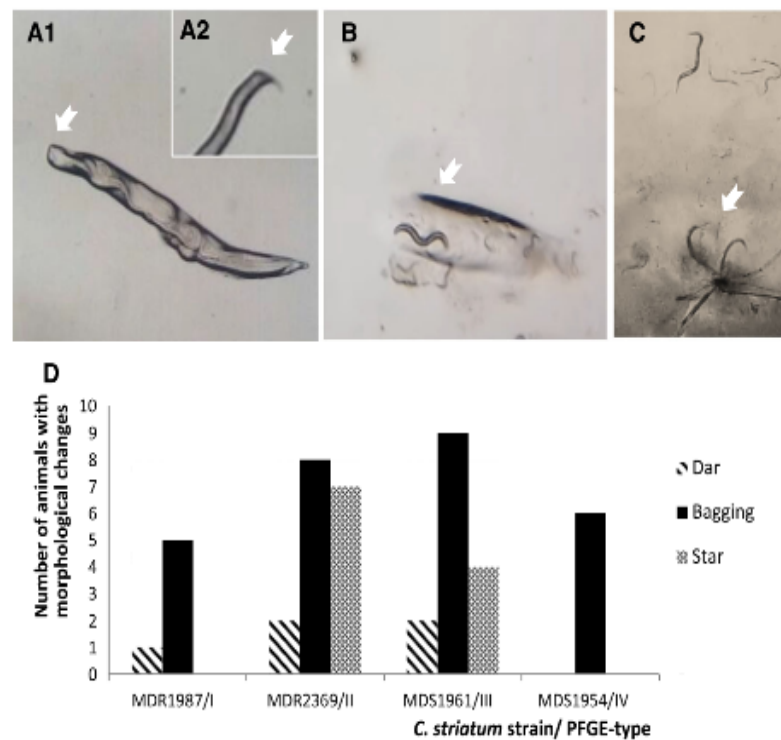


Fig. 2 Induction of morphological changes in *Caenorhabditis elegans* by *Corynebacterium striatum* BR-1987 strain (PFGE type I) isolated from bronchoalveolar lavage (BAL). **a** Tail swelling (Dar phenotype); **b** bacterium-induced internal egg hatching (bagging) and **c** worm-star formation; **d** frequencies of Dar and bagging phenotypes induced by infection with multidrug-resistant (MDR) and multidrug-susceptible (MDS)

C. striatum clinical isolates representative of PFGE types I, II, III, and IV isolated from different clinical sites: BAL (1987/I MDR strain), tracheal aspirate (2369/II MDR strain), urine (1961/III MDS strain), and surgical wound (1954/IV MDS strain). The anal region of the worms is indicated by white arrows. *Escherichia coli* OP50 was used as control

the 1987/I MDR strain isolated from the BAL of a patient with a lower respiratory tract infection. Survival of nematodes (13%) was also observed at 4 days post-infection with the *C. striatum* 1954/IV MDS strain isolated from a surgical wound that led to 87% mortality in infected worms. Evaluation of *C. elegans* survival in response to *C. striatum* contact at 37 °C was not effective due to the inability of nematodes to survive and reproduce at this temperature (data not shown).

C. striatum strains were able to infect and kill *C. elegans* and induce morphological changes similar to those indicated above, as previously described for other nematode pathogens. Consequently, it would be beneficial for *C. elegans* to avoid these bacteria. Evaluation of nematode chemotaxis towards *C. striatum* strains showed that similar behaviour was found for the choice between the *E. Coli* OP50 strain.

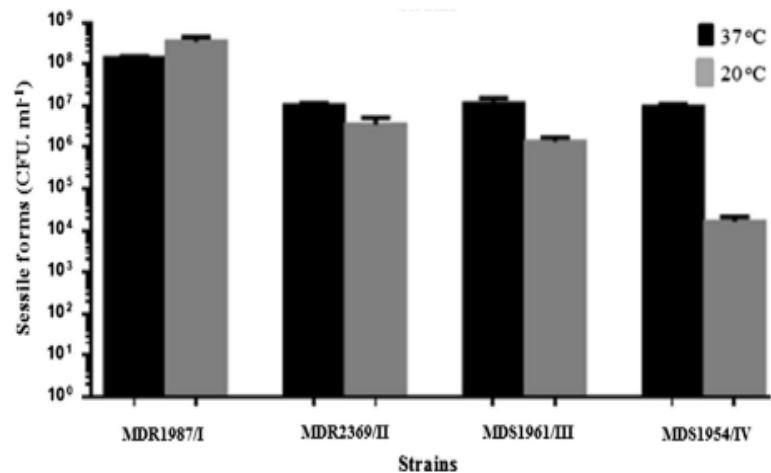
Nematodes did not show the ability to avoid *C. striatum* as a tainted, harmful food source.

Morphological changes

The data displayed in Fig. 2 show that *C. striatum* clinical isolates tested were capable of inducing deformed morphology of the anal region (Dar phenotype), internal egg hatching (bagging), and star formation in *C. elegans* nematodes. Differences in the type and number of infected worms expressing morphological changes were observed for the *C. striatum* strains tested.

The Dar phenotype was observed from the first or second day post-infection with the *C. striatum* strain 1961/III MDS isolated from urine ($n = 2$; 3.33%), the 2369/II MDR strain isolated from the lower respiratory tract ($n = 2$; 3.33%), and the 1987/I MDR strain isolated

Fig. 3 Biofilm formation on polyurethane catheter surface at temperatures of 20 °C and 37 °C by *Corynebacterium striatum* strains



from BAL ($n = 1$; 1.66%). The Dar phenotype was not observed during cultivation of *C. elegans* with the *C. striatum* 1954/IV MDS strain isolated from surgical wounds.

All *C. striatum* strains tested were capable of inducing bagging in *C. elegans*, but in different numbers of infected nematodes. Bagging formation was also observed for the Dar-negative 1954/IV MDS strain isolated from a surgical wound ($n = 6$; 10%). Bagging formation was most pronounced for the *C. striatum* 1961/III MDS strain isolated from urine ($n = 9$; 15%), followed by the 2369/II MDR strain from tracheal aspirate ($n = 8$; 13.33%), 1954/IV MDS strain from a surgical wound ($n = 6$; 10%), and the 1987/I MDR strain isolated from BAL ($n = 5$; 8.33%). Higher capacity for bagging formation was observed for the Dar-negative and MDS (1954/IV) strain from surgical wounds ($n = 6$; 10%) when compared to the Dar-positive and MDR (1987/I) strain from BAL ($n = 5$; 8.33%).

In addition to the ability to induce Dar and bagging phenotypic effects, star formation post-infection was observed only with the two *C. striatum* strains that led to 100% mortality in worms: the 2369/II MDR strain from tracheal aspirate and 1961/III MDS strain isolated from urine. Higher capacity for star formation was observed for the 2369/II MDR strain ($n = 7$), followed by 1961/III MDS strain ($n = 4$). The data emphasize the higher virulence potential of these *C. striatum* strains.

Influence of temperature on biofilm formation on abiotic surfaces

The data displayed in Fig. 3 show that all *C. striatum* strains were able to produce biofilm on catheter

surfaces at temperatures of 20 °C and 37 °C, but at different levels. The viability of sessile forms of biofilm produced on this abiotic hydrophilic surface by the 1987/I MDR strain was higher at both 20 °C and 37 °C when compared with the representative strains of pulsotypes II, III, and IV ($p < 0.05$). Conversely, the lowest number of sessile viable forms of biofilm produced on the polyurethane surface was observed for the 1954/IV MDS strain at 20 °C ($p < 0.05$). Interestingly, most of the strains demonstrated lower biofilm production at 20 °C than at 37 °C ($p < 0.05$). In contrast, increased capacity for biofilm formation was observed at 20 °C for the 1987/I MDR strain ($p < 0.05$). The *C. striatum* 1961/III MDS strain showed similar capacity for biofilm formation as the 2369/II MDR strain at 37 °C ($p > 0.05$), but lower capacity than the 2369/II MDR strain at 20 °C ($p < 0.05$).

Correlation of *C. striatum* microbiological characteristics with mortality rates and morphological changes in infected *C. elegans*

The data presented in Table 1 and Figs. 1 and 2 indicate that mechanisms of nematode killing by *C. striatum* were not directly associated with clinical site, MDR profile, or PFGE type, or with the capacity for biofilm formation on polyurethane catheter surfaces. However, *C. elegans* was found to be capable of distinguishing differences in virulence potential among *C. striatum* clinical isolates.

Mechanisms of nematode killing were demonstrated for *C. striatum* of PFGE types I, II, III, and IV, and MDS and MDR strains isolated from urine,

respiratory tract, a surgical wound. Higher mortality (100%) and morphological changes [Dar ($n = 2$) and bagging ($n = 9$)] were observed for an MDS strain of PFGE type III (1961 strain). Higher mortality rates were observed for *C. striatum* strains isolated from urine and tracheal aspirate samples than from surgical wound and BAL samples. MDR *C. striatum* strains related to respiratory tract infections thus exhibited a distinct ability to kill *C. elegans* nematodes.

Mortality rates correlated with the extent and persistence of colonization and ability for internal egg hatching (worm bagging) within the worms, but not with Dar formation, since a Dar-negative strain (surgical wound 1954/IV MDS) showed higher mortality than a Dar-positive (BAL 1987/I MDR) strain.

The *C. striatum* BAL 1987/I MDR strain expressing the highest capacity for biofilm formation in vitro, at both 37 °C and 20 °C, exhibited the lowest mortality rate for *C. elegans* nematodes (61%).

Discussion

The study of clonal MDR *C. striatum* strains within a nosocomial environment in the Rio de Janeiro metropolitan area demonstrated a predominance of MDR PFGE type I strains isolated mainly from intensive care units and surgical wards. PFGE types I and II were described as related clones. A potential causal link was found between death and *C. striatum* PFGE types I and II infection (Baio et al. 2013).

Despite the long evolutionary distance and differences in growth temperatures between nematodes (20 °C) and mammals (37 °C), *C. elegans* has been increasingly used as an alternative host for the study of bacterial virulence factors required for pathogenesis in mammalian systems (Sifri et al. 2003). Therefore, the virulence potential of *C. striatum*, a human pathogen that preferentially grows at 37 °C, was also verified at a nematode growth temperature (20 °C). In the present study, the virulence potential of *C. striatum* clinical isolates of different MDR and MDS profiles and clonal groups was verified for *C. elegans* nematodes.

C. elegans was previously used to investigate the ability to distinguish between harmless and harmful corynebacterial species in the non-pathogenic *Corynebacterium glutamicum* and the potentially toxicogenic *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* human pathogens. While *C. glutamicum* had a significant

but minor influence on *C. elegans* survival, nematodes were killed by infection with *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*. At a nematode growth temperature (20 °C), *C. elegans* mortality was observed at rates of approximately 20%, 70%, and 90% 5 days after infection with *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, and *C. ulcerans* strains, respectively (Antunes et al. 2016). In the present study, differences in pathogenicity levels were shown for *C. striatum* clinical isolates. Higher levels were verified for two strains that showed complete killing of worms and one strain that led to 83% mortality in a shorter period of time (by 4 days post-infection) than that previously described for *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* (5 days post-infection).

Previous studies have demonstrated that the balance between the MDR and the virulence potential of bacterial pathogens is dependent on the type of resistance mechanisms (Revell and Miller 2001). The present data show that *C. striatum* MDR and MDS strains led to 100% nematode mortality, while a lower pathogenicity level (61% mortality in infected worms) was observed for an MDR (1987/I) strain. Therefore, the pathogenicity of *C. striatum* for *C. elegans* was not directly related to the multidrug resistance profile, in contrast to data previously described for other pathogens, including *Klebsiella pneumoniae* (Bialek et al. 2010).

A correlative analysis of epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant *S. aureus* clones from diverse geographic locations, with virulence measured by a *C. elegans* host model, indicated that strains containing distinct genetic backgrounds had different virulence in the *C. elegans* model. Nematocidal activity was most highly correlated with SCCmec, spa, MLST, and PFGE typing, suggesting that genomic background rather than a single exotoxin characteristic was the most discriminating predictor of virulence (Wu et al. 2013).

Although all tested *C. striatum* strains led to the death of more than 60% of infected worms, only *C. striatum* strains of PFGE types III and II led to 100% nematode mortality, while the PFGE type III strain led to 87% *C. elegans* mortality. Interestingly, MDR 1987 of the PFGE type I strain demonstrated a minor influence on *C. elegans* survival (20 °C), but the highest capacity for biofilm production on polystyrene catheter surfaces (37 °C). Therefore, the data revealed a multifactorial nature of pathogenicity in *C. striatum*, including mechanisms involved in *C. elegans* death.

The data showed that *C. elegans* demonstrated chemotaxis towards *C. striatum* and that the tested *C. striatum* strains were capable of colonizing and killing *C. elegans*. This was confirmed by the observation that the *C. striatum* clinical isolates tested induced morphological abnormalities (Dar and bagging) in addition to star formation in *C. elegans* nematodes. Previous studies found that *C. elegans* was able to avoid pathogenic *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrating aversive olfactory learning (Zhang et al. 2005). Moreover, nematodes were able to distinguish between harmful, potentially toxigenic corynebacteria, such as *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*, and harmless bacterial species including *C. glutamicum* and *E. coli* (Antunes et al. 2016). Interestingly, *C. striatum* strains in the current study showed similar behaviour previously found for the choice between *E. coli* OP50 and *C. glutamicum* strains. Therefore, independent of the pathogenic potential of both non-toxigenic *Corynebacterium* species, *C. striatum* and *C. glutamicum*, *C. elegans* did not show an ability to avoid tainted harmful food sources.

C. striatum strains were also able to colonize *C. elegans* and evoke morphological changes, namely Dar phenotype, bagging, and star formation. Dar-positive phenotypes were observed 1 day post-infection of worms. Of note, one *C. striatum* (MDS 1954/IV) strain was not found to induce morphological abnormalities of the anal region (Dar phenotype). In contrast to *C. striatum*, previous studies found that *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* induced severe tail-swelling (Dar) phenotypes associated with mortality in infected worms (Antunes et al. 2016).

As bacteria influence *C. elegans* fecundity, it is possible that bacterial pathogens influence the reproductive capacity of parasites. Internal egg hatching (bagging) of *C. elegans* nematodes was observed only during cultivation with *C. striatum* strains, and not with *C. diphtheriae* or *C. ulcerans*. Unlike *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*, mortality rates in infected worms correlated with the extent of internal egg hatching (bagging) in *C. elegans* but not with Dar formation (Antunes et al. 2016). The phenomenon of worm-star formation was initially described only for *Leucobacter* infection of nematodes (Hodgkin et al. 2013). Recently, worm-star formation, included among morphological changes typical for nematopathogenic bacteria, was observed with both pathogenic (*C. diphtheriae* and *C. ulcerans*) and non-

pathogenic (*C. glutamicum*) corynebacteria (Antunes et al. 2016). Worm-star formation by nematodes in the present study was observed during cultivation with *C. striatum* strains. However, this striking symptom of surface colonization of *C. elegans* by certain pathogenic bacteria was detected only for *C. striatum* strains that led to 100% mortality in worms. These results reveal the higher virulence potential of certain *C. striatum* strains towards *C. elegans*.

Worm-star, Dar, and bagging formation suggest that distinct but general properties of the genus members, rather than specific virulence factors, may be responsible for the symptoms. OxyR, a transcriptional repressor of the *CAT* gene by a mechanism that is independent of oxidative stress induced by H₂O₂, and the DIP0733 protein, a multifactorial virulence factor that promotes binding to extracellular matrix proteins such as collagen and fibronectin and the ability to adhere to and invade epithelial cells, were also found to contribute to the ability of *C. diphtheriae* to colonize and kill the host in a *C. elegans* infection model system (Antunes et al. 2015). Therefore, virulence factors responsible for these symptoms and mortality in *C. elegans* should be investigated.

Previous studies have also demonstrated that *C. elegans* could serve as a simple animal model (Begun et al. 2007) for studying host–pathogen interactions involving staphylococcal biofilm, and suggested that the protective activity of the biofilm matrix represents an ancient conserved function for resisting predation. Conversely, biofilm formation in *Bacillus subtilis* increased *C. elegans* life span. Biofilm-proficient *B. subtilis* colonized the *C. elegans* gut and extended worm life span to a greater degree than biofilm-deficient isogenic strains (Donato et al. 2017). The capacity for biofilm formation on different abiotic surfaces by *C. striatum* was demonstrated previously. In the present study, biofilm formation by *C. striatum* was related to mortality in infected *C. elegans*, but at different levels. *C. striatum* strains expressing the ability to form biofilm at both temperatures tested in vitro (37 °C and 20 °C) led to mortality of 61–100% of *C. elegans* nematodes. Similar to staphylococci, biofilm formation may contribute to resistance to predation of *C. striatum* by *C. elegans*. In contrast to the findings for *B. subtilis*, biofilm formation by *C. striatum* did not lead to extended worm life span.

Exposure to temperatures of approximately 37 °C in mammalian hosts commonly results in the

upregulation of a range of virulence factors. However, for some pathogens, virulence factors required for colonization and invasion may be preferentially expressed at lower temperatures, as shown for *Yersinia* spp. (20 °C). Previous studies reported that *Yersinia* spp. killed *C. elegans* via a mechanism associated with the formation of a biofilm around the anterior (head) and along the surface of the nematodes. These types of virulence factors expressed at low temperatures were found to be required to regulate innate immunity pathways conserved in nematodes, fleas, and mammals (Revell and Miller 2001; Hinnebusch et al. 1996; Joshua et al. 2003). The results of the current study show that all tested MDR and MDS *C. striatum* strains of different PFGE types were capable of biofilm formation in vitro at 20 °C and 37 °C, which may protect *C. striatum* against *C. elegans* immune defenses for *C. striatum* strains; biofilm formation in vitro was preferentially demonstrated at a high temperature (37 °C). Comparative analysis of biofilm formation at the two temperatures indicated that *C. striatum*, including strains that led to 100% mortality in *C. elegans*, demonstrated lower levels of biofilm production at 20 °C. Interestingly, an increase in biofilm formation was observed for one strain at a lower temperature (20 °C). The results indicate that exposure to temperatures of around 20 °C may result in downregulation of some virulence factors of *C. striatum*, including biofilm formation.

In conclusion, the study results show that *C. striatum* possesses virulence potential towards *C. elegans*. Factors associated with morphological changes may include components of the corynebacterial cell envelope. Additional virulence factors and environmental conditions with regard to mortality and morphological changes in corynebacterial-infected nematodes warrant further investigation. In addition, further studies are needed to explore the use of *C. elegans* as a model for studying the molecular biology of *C. striatum* pathogenesis and host immune response.

Acknowledgements *In memory:* Doctor Raphael Hirata Júnior

Author contributions Study conception or design: CS, LSL, ALMG. General orientation of the study: ALMG. Conductance of research: CS, LSL, HFM, YFV, FCO, SCS, MEFCC, AESC. Data analysis: CS, LOM, ALMG. Contribution of new methods or models: MGL, CSS. Writing of the paper: CS, LSL, ALMG.

Funding Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR-2/ UERJ).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they do not have a conflict of interest.

Ethical approval This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital University Pedro Herneiro of Rio de Janeiro City (no. CEUA CONCEA-029/2015).

References

- Aballay A, Yorgey P, Ausubel FM (2000) *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 10:1539–1542
- Antunes CA, Sanches LS, Hacker E, Köhler S, Bösl K et al (2015) Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology* 161:639–647
- Antunes CA, Clark L, Marie-Therese W, et al. (2016) *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria. *Microbiol Res* 162:84–93
- Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN et al (2013) Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(1):23–29
- Begun J, Gaiani JM, Rohde H, Mack D, Calderwood SB et al (2007) Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* 3(4):57
- Bialek S, Lavigne J, Chevalier J, Marcon E, Leflon V et al (2010) Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Ant Agents Chemother* 54:4373–4378
- Campanile F, Carretto E, Barbarini D, Grigis A, Falcone M et al (2009) Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains. *Emerg Infect Dis* 15(1):75–78
- Ceri H, Oslan D, Mork D, Storey R, Read A et al. (2001) The MBEC assay system: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocid susceptibility testing. *Grow Biof* 337: 337–385.
- Creagh RJM, Saavedra FJ, Rodríguez P, Rodríguez MD (2000) Pneumonia caused by *Corynebacterium striatum* in a patient with AIDS. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 18:297–298
- Donato V, Ayala FR, Cogliati S, Bauman C, Costa JG (2017) *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through downregulation of the insulin-like signalling pathway. *Nat Commun* 8:14332
- Fernández-Ayala M, Nan DN, Fariñas MC (2001) Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. *Am J Med* 111:167

- Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh KV et al (2001) A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 98:10892–10897
- Hashizume et al (2016) Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum* confirmed by 16S ribosomal RNA sequencing. *Infect Chemother* 48(3):239–245
- Hinnebusch BJ, Perry RD, Schwan TG (1996) Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. *Science* 273:367–370
- Hodgkin J, Félix MA, Clark LC, Stroud D, Gravato-Nobre MJ (2013) Two *Leucobacter* strains exert complementary virulence on *Caenorhabditis* including death by worm-star formation. *Curr Biol* 23:2157–2161
- Joshua GW, Karlyshev AV, Smith MP, Isherwood KE, Titball RW, Wren BW (2003) A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology* 149:3221–3229
- Masuda H, Takafumi M, Mina T, Haru K (2018) Interactive 26 A life-threatening infection due to *Corynebacterium striatum* a lesson learned. *Eur Assoc Cardio Thorac Surg* 26:709–710.
- Mattos-Guaraldi AL, Guimarães LC, Santos CS, Veras AAO et al (2015) Draft genome sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09 a multidrug-susceptible strain isolated from the urine of a hospitalized 37-year-old female patient. *Genome Announc* 3:00869–915
- Mosser T, Matic I, Leroy M (2011) Bacterium-induced internal egg hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Appl Environ Microbiol* 77:8189–8192
- Oliva A, Belvisi V, Iannetta M, Andreoni C, Mascellino MT et al (2010) Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. *J Clin Microbiol* 48:4669–4671
- Revell PA, Miller VL (2001) *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 205:159–164
- Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, Calderwood SB (2003) *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun* 71:2208–2217
- Souza C, Faria YV, Sant'Anna LO et al (2015) Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:242–248
- Wu LY, Gao B, Zhang F, Sun XL et al (2013) A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of *staphylococcal* enterotoxin B in milk. *Talanta* 106:360–366
- Zhang S, Chen Y, Potvin E, Sanschagrín F, Levesque RC et al (2005) Comparative signature-tagged mutagenesis identifies *Pseudomonas* factors conferring resistance to the pulmonary collectin SP-A. *PLoS Pathog* 1:259–268

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

4.4 Artigo 4 - Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum* (Artigo publicado)

Artigo 4 - Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*.

Autores: Ramos JN, Souza C, Faria YV, Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, Seabra SH, Moreira LO, Santos CS, Mattos-Guaraldi AL, Vieira VV.

Revista: BMC Infectious Diseases (2019); 19:672. (Qualis A2)

Resumo

Introdução: *Corynebacterium striatum* multirresistente a agentes antimicrobianos (MDR) é um patógeno, emergente associado a pacientes imunocomprometidos e cronicamente doentes, bem como a surtos nosocomiais. No presente estudo, foram caracterizadas 23 amostras MDR de *C. striatum* isoladas de infecções hematogênicas e/ou associadas ao uso de cateteres de hospital do Rio de Janeiro. **Métodos:** Amostras de *C. striatum* foram identificadas por sequenciamento de genes 16S rRNA e rpoB. Os perfis clonais das amostras foram determinados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Todas as amostras foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelos métodos de disco-difusão e de determinação de concentração inibitória mínima (tiras-teste). Genes de resistência antimicrobiana foram detectados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A capacidade de produção em quatro superfícies abióticas foi avaliada por ensaios quantitativos e qualitativos incluindo microscopia eletrônica de varredura (MEV) em cateteres de poliuretano e silicone. **Resultados:** Nos ensaios de PFGE foram detectados 11 perfis clonais (PFGE), distintos a partir das 23 amostras de *C. striatum* estudadas. O perfil clonal I foi detectado no maior número de amostras. Cinco perfis MDR diferentes foram encontrados e todos os isolados do perfil clonal I apresentaram suscetibilidade apenas à tetraciclina, vancomicina, linezolida e daptomicina. Apenas a amostra MDS não apresentou mutações na região determinante de resistência à quinolona (QRDR) do gene *gyrA* além da ausência de genes que codificam resistência a antibióticos. As 22 amostras MDR apresentaram genes de resistência a aminoglicosídeo, macrolídeos/lincosamidas e cloranfenicol além de apresentaram mutações no QRDR do gene *gyrA*. Ensaio de MEV ilustraram a capacidade de produzir biofilme maduro em superfície do cateter de poliuretano e silicone pela amostra MDR isolada de sangue pertencente ao clone epidêmico (PFGE - I). **Conclusões:** A análise de genotipagem por PFGE revelou a permanência do perfil PFGE MDR I no ambiente nosocomial. Outros novos perfis clonais surgiram como agentes etiológicos de infecções invasivas. No entanto, as amostras MDR de *C. striatum* pertencentes ao perfil clonal I também foram predominantemente encontradas entre os pacientes com infecções hematogênicas. O alto nível de resistência a múltiplos fármacos, associado à capacidade de formação de biofilme observada em MDR *C. striatum*, é um caso preocupante.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*



Juliana Nunes Ramos^{1,2,3*}, Cassius Souza¹, Yuri Vieira Faria^{1,4}, Eliane Cristine da Silva¹, João Flávio Carneiro Veras², Paulo Victor Pereira Baio^{1,3}, Sérgio Henrique Seabra⁴, Lilian de Oliveira Moreira⁵, Raphael Hirata Júnior¹, Ana Luíza Mattos-Guaraldi¹ and Verônica Viana Vieira³

Abstract

Background: *Corynebacterium striatum* is an emerging multidrug-resistant (MDR) pathogen associated with immunocompromised and chronically ill patients, as well as nosocomial outbreaks. In this study, we characterized 23 MDR *C. striatum* isolated of bloodstream and catheter-related infections from a hospital of Rio de Janeiro.

Methods: *C. striatum* isolates were identified by 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing. The dissemination of these isolates was accomplished by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). All isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion and by minimum inhibitory concentration using E-test strips methods. Antimicrobial resistance genes were detected by polymerase chain reaction. Quantitative tests were performed on four different abiotic surfaces and the ability to produce biofilm on the surface of polyurethane and silicone catheter was also demonstrated by scanning electron microscopy.

Results: Eleven PFGE profiles were found. The PFGE profile I was the most frequently observed among isolates. Five different MDR profiles were found and all PFGE profile I isolates presented susceptibility only to tetracycline, vancomycin, linezolid and daptomycin. Only the multidrug-susceptible isolate did not show mutations in the quinolone-resistance determinant region (QRDR) of the *gyrA* gene and was negative in the search of genes encoding antibiotic resistance. The other 22 isolates were positive to resistance genes to aminoglycoside, macrolides/lincosamides and chloramphenicol and showed mutations in the QRDR of the *gyrA* gene. Scanning electron microscopy illustrated the ability of MDR blood isolate partaker of the epidemic clone (PFGE profile I) to produce mature biofilm on the surface of polyurethane and silicone catheter.

Conclusions: Genotyping analysis by PFGE revealed the permanence of the MDR PFGE profile I in the nosocomial environment. Other new PFGE profiles emerged as etiologic agents of invasive infections. However, the MDR PFGE profile I was also found predominant among patients with hematogenic infections. The high level of multidrug resistance associated with biofilm formation capacity observed in MDR *C. striatum* is a case of concern.

Keywords: Antimicrobial multiresistance, Bacteremia, Biofilm, Catheter-related infection, *C. striatum*, Nosocomial outbreak

* Correspondence: jnr.uerj@gmail.com

¹Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Centro Colaborador e Referência para pesquisa de Difteria/Ministério da Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

²Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, INCCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Corynebacterium genus consists of Gram-positive aerobic or anaerobic facultatively pleomorphic rods with a high G + C content DNA. Some species are part of human skin or mucosa [1, 2]. *Corynebacterium striatum* has been increasingly associated with severe infections in both immunocompetent and immunocompromised hosts [3, 4]. However, *C. striatum* isolates have been included among the etiologic agents of bacteremia with or without central venous catheter (CVC) in place [5, 6], endocarditis [7], breast abscesses [8], septic arthritis [2], osteomyelitis [4] and several other invasive diseases. In addition, studies have evidenced *C. striatum* as an emerging multidrug-resistant (MDR) pathogen related to nosocomial outbreaks in several countries [9–16].

The main risk factors for acquisition MDR *C. striatum* infections highlighted by Verroken et al. [13] were: prolonged hospital stay, advanced stage of chronic obstructive pulmonary disease, recent administration of antibiotics and exposure to an invasive diagnostic procedure. Besides, empirical antibiotic therapy may select MDR Gram-positive skin flora that can become the etiologic agent of nosocomial invasive diseases [17]. The emergence of MDR *C. striatum* and its involvement in nosocomial infections require appropriate interpretive criteria to the selection of the adequate antibiotic therapy [16].

Most reports of nosocomial infections and outbreaks caused by *C. striatum* mainly encompassed the respiratory tract [10, 13, 18]. On the other hand, few studies have investigated bloodstream and catheter-related infections by *C. striatum* [15, 19–21]. In a Brazilian tertiary care hospital located at Rio de Janeiro metropolitan area, a nosocomial outbreak caused by MDR *C. striatum* mostly isolated from tracheal aspirates samples was initially verified in 2009 [12]. Subsequently, cases of bloodstream and catheter-related infections caused by *C. striatum* isolates were noticed in the same hospital. In the present study, we aimed to investigate the clonal relationship, antimicrobial susceptibility profiles, ability of biofilm formation, molecular detection of resistance genes to aminoglycosides, quinolones, compounds of the MLSB group (macrolides and lincosamides) and chloramphenicol of these *C. striatum* invasive isolates.

Methods

Study design and origin of bacterial isolates

Twenty three *C. striatum* isolates recovered from blood and catheter samples of 21 hospitalised patients with signs and symptoms of bacteremia ($n = 13$) and catheter-related infections ($n = 10$) were analysed for microbiological features (Table 1). Two of these isolates (2023 and 2038, PFGE profiles I and II, respectively) were previously studied by Baio and co-workers [12]. The patients were hospitalised during a 42-month period (January 2009 –

February 2013) in 13 different wards of Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) - a tertiary care hospital belong to Universidade Estado Rio de Janeiro (UERJ) ($n = 22$) and Hospital Municipal Jesus (HMJ) ($n = 1$), both located at the metropolitan area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The 2296 isolate came from a patient with CVC-related infection from HMJ and it was sent to the Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica/UERJ for identification of the pathogen. *C. striatum* was isolated from blood samples and catheters segments of patients with signs and symptoms of bacterial infections as part of the medical care procedures of both hospitals. The consent to participate was not required because all the investigated isolates were taken as a part of standard care (diagnostic purposes). This study focused on bacteria and no identifiable human data were used. All the isolates were deposited in the CBAS/Fiocruz (Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde of Fundação Oswaldo Cruz) culture collection.

Bacterial isolates collection, culture conditions and phenotypic identification procedures

Clinical specimens were inoculated in Bactec Plus anaerobic/aerobic vials and analysed in a Bactec 9240 continuous-monitoring system (Becton-Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, USA). *Corynebacterium*-like colonies were selected for identification when they were grown in significant numbers (> 15 colonies) or in pure culture from blood or catheter samples, as recommended by Maki's semi quantitative method to distinguish infection (> 15 colonies) from contamination of catheter-tips [22]. Bacterial isolates were identified by conventional phenotypic characterization [12, 23] and Vitek 2 (bioMérieux, France) using Anaerobe and *Corynebacterium* card.

C. striatum molecular identification by 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing

Molecular identification was performed according with protocols previously described [12]. The 16S rRNA and *rpoB* genes sequences were compared to type strains sequences available in the National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov) using the BLAST algorithm and/or the Eztaxon server [24].

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Pulsed-field gel electrophoresis was performed as described by Baio and co-workers [12]. PFGE banding profiles were analyzed using visual comparison among the isolates, according to the criteria established by Tenover and co-workers [25] and by automated analysis using the BioNumerics Fingerprinting software (Version 4.0, Applied Math, Belgium). PFGE profiles were identified by roman numerals and subtypes were

Table 1 Origin and PFGE profiles of 23 *Corynebacterium striatum* isolates from blood (n = 13) and catheter-related (n = 10) infections

Patient/ Isolation date	Isolates	Hospital wards	Gender	Isolation site	Culture	PFGE profiles ^a
Aug2009	2023	General ICU ^b	M ^c	Blood	Pure	I
Sept.2009	2038	Infectious diseases	F ^d	Blood	Pure	II
Apr.2010	2089	General ICU	M	Catheter tip	Pure	I
Apr.2010	2091	Infectious diseases	F	Blood	+ <i>Acinetobacter</i> sp.	I
May2010	2103	Infectious diseases	F	Catheter tip	Pure	VII
Aug2010	2130	Dermatology	F	Blood	Pure	V
Feb2011	2228	Cardiac ICU	F	Blood	Pure	VI
Feb2011;	2230;	Clinical ICU	M	Blood	Pure	VI
March2011	2237			Blood	Pure	VI
March2011	2243	General care	F	Blood	Pure	I
March2011	2245	General ICU	M	Catheter tip	Pure	I
June2011	2285	General ICU	F	Central venous catheter	Pure	I
July2011	2296	HMJ-RJ ^e	M	Central venous catheter	N ^f	VI
Aug2011	2308	Hematology	M	Blood	Pure	I
Aug2011	2316	Orthopedic	M	Blood	+ CNS ^g	I
Oct2011	2324	Pulmonary	F	Catheter tip	+ CNS	Ia
Apr2012	2376	Neonatal ICU	F	Catheter tip	Pure	X
May2012	2390	General care	F	Catheter tip	Pure	Via
June2012	2401	Thoracic Surgery	M	Blood	Pure	II
Aug2012;	2425;	Hematology	F	Blood	Pure	IX
Sept2012	2432	Pediatric		Blood	Pure	IX
Nov2012	2439	General care	M	Catheter tip	Pure	Ib
Feb2013	2454	General care	F	Catheter tip	+ CNS/ <i>KlebsiellaPneumoniae</i>	I

^aI-X, PFGE profiles. Previously described non-MDR isolates of PFGE types III and IV were not found in patients with blood and catheter-related infections (Baio et al. 2013); ^bICU, intensive care unit; ^cM, male; ^dF, female; ^eN, Not informed; ^fHMJ - RJ, Hospital Municipal Jesus - Rio de Janeiro; ^gCNS, Coagulase-negative staphylococci

identified by roman numerals followed by a letter. The similarity index of the isolates was calculated using the Dice correlation coefficient with a band position tolerance of 1%. The unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA) was used to construct a dendrogram. PFGE profiles that showed similarity coefficient $\geq 85\%$ were considered genetically related [26, 27]. The isolates previously studied, 1961 (PFGE profile III) and 1954 (PFGE profile IV) were used as controls [12].

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility profiles were determined by the disk diffusion and by minimum inhibitory concentration (MIC) using E-test strips methods in cation-adjusted Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood using inoculum equivalent to a 0.5 McFarland standard. Seven antibiotic disks (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) were used: clindamycin (2 μ g), moxifloxacin (5 μ g), gentamicin (10 μ g), rifampicin (5 μ g) and vancomycin (5 μ g), according Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST [28]. Another three

antimicrobials imipenem (10 μ g), erythromycin (15 μ g) and chloramphenicol (30 μ g) were interpreted in accordance to criteria defined by BrCAST for *Staphylococcus* spp. These antibiotics are not considered in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and BrCAST/EUCAST guidelines for *Corynebacterium* spp. Linezolid 30 μ g was interpreted in accordance to criteria defined by CLSI [29] for *Staphylococcus* spp. The BrCAST document recommends the use of linezolid 10 μ g for antimicrobial susceptibility testing, but this is not found commercially available in Brazil.

Antimicrobial susceptibility to daptomycin, penicillin, ciprofloxacin and tetracycline were determined by MIC using E-test strips (AB Biodisk, Sweden). Interpretation of values to penicillin, ciprofloxacin and tetracycline were performed also according BrCAST [28]. Due to absence of daptomycin breakpoints in this guideline, the interpretation of values was performed according to CLSI M45-A2 document [30]. MDR was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories [31].

Amplification and sequencing of the genes related to resistance

The amplification and sequencing of the QRDR region of the *gyrA* gene was performed following protocols described by Sierra and co-workers [32]. Mutations in the QRDR region of the *gyrA* gene were identified by aligning of amino acids sequences and compared to the sequence of *C. striatum* ATCC 6940 (GenBank accession number AY559038) using Clustal X program [33]. The 23 *C. striatum* isolates also were screened for the presence of genes codifying antibiotic resistance, *ermX* (macrolides and lincosamides), *aphA* (aminoglycoside) and *cmx* (chloramphenicol), by PCR using primers specific for each gene [11, 34]. For each gene, one amplicon was purified and sequenced according with protocols previously described by Baio and co-workers [12].

Semi-quantitative analyses of biofilm formation on polyurethane and silicone catheter surfaces

Sterile 4 cm segments of 16-gauge percutaneous nephrostomy polyurethane and silicone catheters were immersed in TSB containing 10^6 CFU ml⁻¹ of *C. striatum* and incubated at 37 °C for 48 h then Maki's semi-quantitative roll plate technique were performed. Basically, after washing (three times) with phosphate buffered saline (PBS) 0.1 M pH 7.2, contaminated abiotic substrates were rolled up on Columbia agar plates supplemented with 5% sheep blood (Oxoid, Germany) for 48 h at 37 °C were analyzed presence of bacterial carpet [23, 35].

Quantitative tests of biofilm formation on different on catheter abiotic surfaces

Quantitative analysis of viable sessile cells of representative isolates of PFGE profile I (2023) and II (2038) was evaluated by quantitative tests based on previously described methods [35] and using the following abiotic substrates: surfaces of glass tubes, Thermanox cover slips (Nunc), catheters fragments of polyurethane and metal tips (Intracath; Deseret Pharmaceutical Co., Sandy, Utah). Each experiment was carried out in triplicate and repeated three times. Results of the viable cell counts of experiments performed with the 2023 and 2038 isolates were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple-comparison post-test. The values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Morphological aspects of biofilm formation polyurethane and silicone catheters

The biofilm produced (48 h incubation) on the surface of in vitro prepared on fragments of polyurethane and silicone catheters by *C. striatum* isolates from

blood, 2023 (PFGE profile I) and 2038 (PFGE profile II), were demonstrated by Scanning Electron Microscopy (SEM). Specimen preparation and staining protocol for SEM were performed as described by Souza and co-workers [35]. Catheter segments infected in vitro with *C. striatum* 1987 (PFGE profile I), 2369 (PFGE profile II), 1961 (PFGE profile III) and 1954 (PFGE profile IV) isolates were used as positive controls [35].

Results

C. striatum genotypic identification

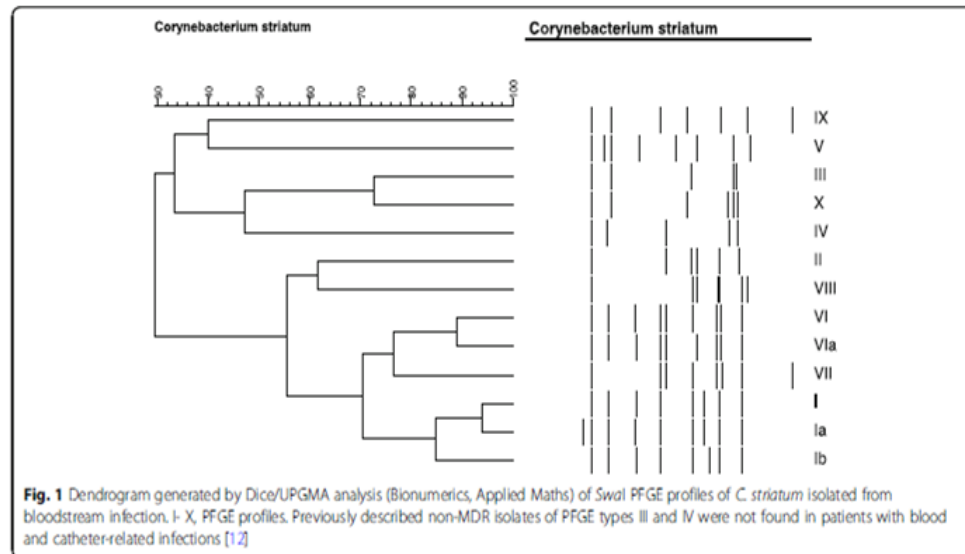
The analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes sequences from 23 isolates from blood and catheter samples exhibited the highest similarity values with *C. striatum* ATCC 6940 type strain, ranging from 99.77–99.12% and 99.28–98.65%, respectively. GenBank accessions for *C. striatum* 16S rRNA and *rpoB* genes were deposited: KJ934779 to KJ934789, KM001910 to KM001914, KJ855309 to KJ855313, KR010627 to KR010645, KR020513 and KR020514.

PFGE analysis

Eleven PFGE profiles among *C. striatum* isolates were designated I, Ia, Ib, II, V, VI, VIa, VII, VIII, IX and X (Table 1; Fig. 1; Additional files 1 and 2). The PFGE profile I was the most frequently ($n = 9$) observed among isolates (Table 1). The PFGE profiles I, Ia and Ib showed similarity coefficient $\geq 85\%$ were considered genetically related. The PFGE profiles VI and VIa showed similarity coefficient $\geq 90\%$ were also considered genetically related. PFGE analysis indicated that bloodstream infections in cases 8 and 19 were due to particular clones of *C. striatum*: PFGE profiles VI (2230 and 2237 isolates) and IX (2425 and 2432 isolates), respectively. PFGE profile X was related to a case of catheter-related infection in a 3 months-old patient from Neonatal ICU. *C. striatum* PFGE profile VII was isolated only from patient with CVC infection from HMJ-RJ (Table 1). *C. striatum* PFGE profile I isolates were detected in patients with bloodstream and/or catheter-related infections during the years of 2009 ($n = 1$), 2010 ($n = 2$), 2011 ($n = 5$), 2013 ($n = 1$) but not 2012.

Antimicrobial multiresistance profiles

Antimicrobial susceptibility profiles of 23 *C. striatum* isolates are displayed in Table 2. Except the 2376 isolate from Neonatal ICU, all *C. striatum* isolates, independent of their PFGE profiles and hospital settings, showed non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories and were consequently identified as MDR pathogens. Twenty-two *C. striatum* isolates exhibited five different multiresistance levels corresponding to five different MDR profiles: A, with resistance to 9 antimicrobial agents; B and B1, resistance to 8



antimicrobial agents; C, resistance to 7 antimicrobial agents; and D, with resistance to 6 antimicrobial agents. All *C. striatum* isolates related to bloodstream and catheter-related infections, representative of different PFGE profiles, showed susceptibility to tetracycline, vancomycin, linezolid and daptomycin. *C. striatum* isolates, independent of PFGE profiles showed resistance to penicillin (100%), ciprofloxacin and moxifloxacin (95.6%), clindamycin (95.6%), erythromycin (95.6%), gentamicin (91.3%), rifampin (52.2%), imipenem (76.2%) and chloramphenicol (95.6%). MDR profile A was demonstrated for 8 *C. striatum* PFGE profile I isolates. Moreover, MDR profile A was also shown for *C. striatum* isolates PFGE profiles Ib, II and VIII.

Molecular detection of resistance genes

The sequences of the QRDR region of the *gyrA* gene of 22 isolates characterized as resistant to fluoroquinolones were compared to that of the quinolone-susceptible *C. striatum* ATCC 6940 (MIC = 0.094 mg/L) and with our multidrug-susceptible (MDS) 2376 isolate (MIC = 0.125 mg/L). The relationships between the mutations in the QRDR region *gyrA* gene and the MICs of ciprofloxacin of the 23 isolates and *C. striatum* ATCC 6940 are summarized in Table 3. Twenty-one isolates showed MIC > 32 mg/L to ciprofloxacin, fifteen of them carried a mutation only the position 87 generating a change from Ser-87 to Val. The 2324 and 2401 isolates carried a double mutation, generating a change from Ser-87 to Val and Asp-91 to Asn. The 2130 isolate had MIC = 2 mg/L and carried a mutation only in position 87 (Ser-87 to Tyr). All sequences of QRDRs region *gyrA* gene were

deposited in GenBank/NCBI under numbers MG010347–MG010369.

The genes codifying for antibiotic resistance, *ermX* (macrolides and lincosamides), *aphA* (aminoglycoside) and *cmx* (chloramphenicol) were found except in MDS 2376 isolate. Twenty-two isolates resistant to erythromycin, clindamycin and chloramphenicol presented *ermX* and *cmx* genes. These isolates were also *aphA*-positive and resistant to gentamicin, except for one isolate. The 2130 isolate was *aphA*-positive and susceptible to gentamicin, confirmed by MIC using E-test strip gentamicin. Analysis of genes sequences exhibited high similarity values (above 99%) with those deposited in NCBI. The sequences were deposited in GenBank/NCBI under numbers MF872250 to MF872252.

Quantitative tests of biofilm formation on different catheter abiotic surfaces

Results of quantitative analysis of viable sessile cells of MDR *C. striatum* isolates 2023 and 2038 (PFGE profiles I and II, respectively) are shown in Fig. 2. Viable sessile bacterial cells were detected 48 h post-infection on surfaces of all types of abiotic substrates tested, but at different levels. *C. striatum* 2023 isolate (PFGE profile I) showed a higher ability to adhere to glass surface, a hydrophilic and positively charged abiotic surface ($p < 0.001$). In addition to glass, *C. striatum* 2023 isolate also exhibited a significantly ($p < 0.001$) greater level of adherence to an abiotic hydrophilic (polyurethane) positively charged surface compared with *C. striatum* 2038 isolate (PFGE profile II). Conversely, *C. striatum* 2038 isolate exhibited a significantly ($p < 0.001$) greater level

Table 2 Antimicrobial susceptibility profiles of 23 *Corynebacterium striatum* isolates from blood (n = 13) and catheter-related (n = 10) infections

Isolates	PFGE profiles	Penicillin	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gentamicin	Chlramphenicol	Erythromycin	Rifampin	Isipenem	Chloramphenicol	Resistance Profile
2023	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2089	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2091	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2145	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2285	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2308	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2316	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2454	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2459	Ob	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2058	II	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2103	VII	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
2343	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	B
2324	IIa	R	R	R	R	R	R	R	R	R	B
2228	VI	R	R	R	R	R	R	R	R	R	B
2230	VI	R	R	R	R	R	R	R	R	R	B
2237	VI	R	R	R	R	R	R	R	R	R	B
2290	VIIa	R	R	R	R	R	R	R	R	R	B1
2401	II	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C
2425	IX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C
2432	IX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C
2295	VI	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C
2130	V	R	R	R	R	R	R	R	R	R	D
2376	X	R	R	R	R	R	R	R	R	R	E
Resistance %		100	95.6	95.6	91.3	95.6	95.6	52.2	76.2	95.6	

R resistant, S susceptible

Table 3 Relationship between mutations in the QRDR region and the MICs for 23 *C. striatum* isolates and ATCC 6940

Number of isolates	Ciprofloxacin		GyrA (amino acids)	
	MIC (mg/L)	Phenotype	Position 87	Position 91
15	> 32	R	Val	Asp
2	> 32	R	Val	Asn
1	> 32	R	Phe	Asp
3	> 32	R	Phe	Ala
1	2	R	Tyr	Asp
1	0.125	S	Ser	Asp
ATCC 6940 ^a	0.094	S	Ser	Asp

^a GenBank accession number AY559038

of adherence to negatively charged and hydrophobic polystyrene (Thermanox) surface compared with 2023/PFGE profile I isolate. Interestingly, both *C. striatum* isolates (PFGE profiles I and II) were able to strongly adhere and survive on the metal surface with similar intensities ($p = 0.374$) (Fig. 2).

Semi-quantitative analyses biofilm produced in vitro model of catheter infection

Results of the semi-quantitative roll plate method (> 15 CFU) showed extensively adherent viable sessile forms for both *C. striatum* isolates (2023 and 2038) on fragments of polyurethane and silicone catheters, as illustrated in Fig. 3a.

Morphological aspects of biofilm formation on polyurethane and silicone catheters evaluated by SEM

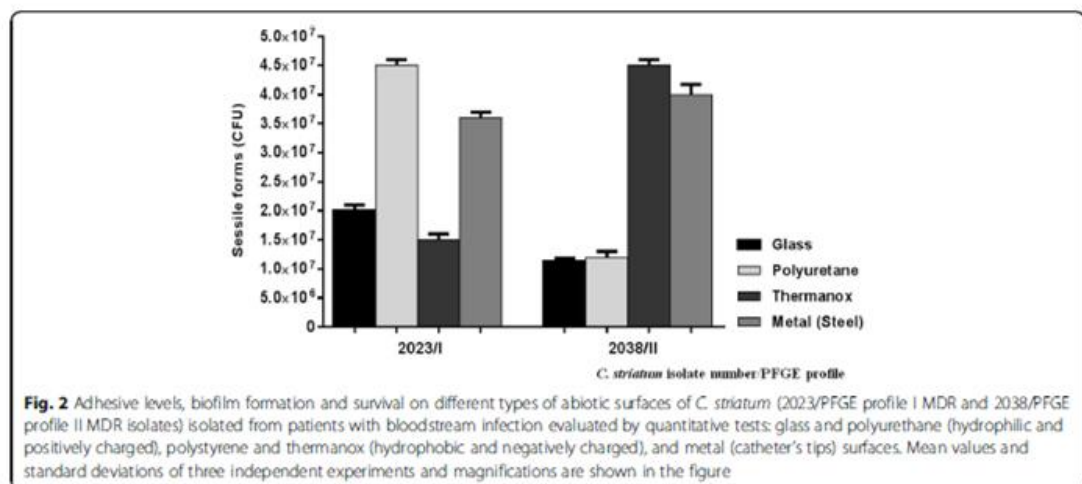
Micrographs illustrating biofilm formation on the surface of polyurethane and silicone catheters by *C. striatum* 2023/PFGE profile I (Fig. 3b-d) and 2038/PFGE profile II (Fig. 3e, f) isolates demonstrated by SEM are displayed in Fig. 3b-f; Fig. 3c showed microcolony formation (a

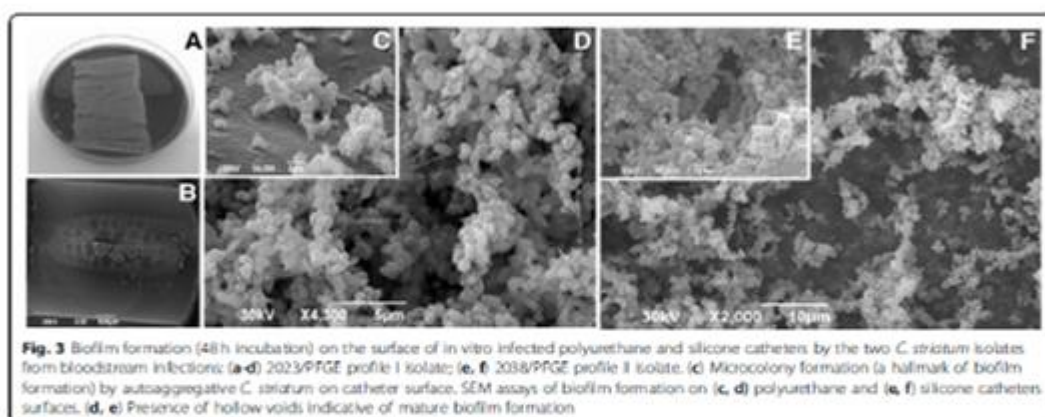
hallmark of biofilm formation) by auto aggregative *C. striatum* on polyurethane surface. SEM assays also evidenced the presence of hollow voids indicative of mature biofilm formation on surfaces of polyurethane (Fig. 3d, e) and silicone (Fig. 3f) catheters.

Discussion

Antimicrobial resistance has a major impact on human health [36]. At present, reports on the emergence and spread of multiresistant bacterial species are important to support the progress of resistance control policies. Our data show bloodstream and catheter-related infections caused by different clones of MDR *C. striatum* in Brazil. In accordance to Chen and co-workers [37], our findings emphasize that *C. striatum* from blood and catheter segments should not be considered only as contaminant, since in our study most of the isolates were found in pure cultures (82%) or in significant numbers.

In Brazil the isolation of *C. striatum* from hospitalized patients with signs and symptoms of infection was observed in some studies [38–40]. In a previous study, we documented four PFGE profiles during a nosocomial outbreak caused by *C. striatum* in Rio de Janeiro, Brazil. MDR clones related to the profiles of PFGE I and II were predominant. In that opportunity only two isolates of PFGE I and II profiles were isolated from blood samples [12]. Due to subsequent increased number of cases of bloodstream and catheter-related infections caused by *C. striatum* isolates in HUPE, current investigation of the clonal relationship of these *C. striatum* isolates revealed the permanence of the MDR PFGE profiles I and II in the nosocomial environment as invasive clones. However, the PFGE I profile was found predominant among patients with hematogenic infections. In addition, other new MDR PFGE profiles (V to IX) emerged as





etiologic agents of bloodstream and catheter-related infections. Interestingly, one non-multiresistant clone (PFGE profile X) was also related to a case of catheter-related infection in the newborn.

PFGE is a valuable tool to investigate the clonal relatedness of microbial strains during nosocomial outbreaks. Several nosocomial infections and outbreaks studies have employed this methodology for typing of *C. striatum* isolates [13, 15, 16, 18]. PFGE is a stable and reproducible genotyping method, however, it is time consuming and standardizations for inter-laboratory comparisons do not exist for *C. striatum* isolates genotyping. Thus, the method is only applicable to compare isolates for regional epidemiology surveillance. Gomila and co-workers described the development of a multilocus sequence typing (MLST) scheme for *C. striatum*. [9]. However, the proposed MLST scheme has not been adopted by scientific community, perhaps due to the limited number of genes (ITS1 region, *gyrA* and *rpoB*) that comprise it. PFGE has limitations but it is the tool available so far for the discrimination of this bacterial species. Future researches are required to evaluate genotyping methods that provide useful data for global surveillance of infections caused by *C. striatum*.

Antimicrobial susceptibility testing remains rarely performed on *Corynebacterium* spp. in many laboratories [41]. The method of susceptibility by disk-diffusion is widely used by microbiology laboratories in Brazil and in other countries [12, 42–44]. Moreover, CLSI guidelines do not provide breakpoints for disk-diffusion while BrCAST, based in EUCAST document, provides breakpoints for corynebacteria susceptibility testing only for some antibiotics [28, 29], excluding various antimicrobials, such as cephalosporins, carbapenems and lipopeptides, thus many researchers often use staphylococcal

breakpoints [12, 16, 45]. Susceptibility testing should be performed on clinically significant *C. striatum* isolates. However, studies suggest that according to the severity of the infection, empiric treatment should be carried out with vancomycin and linezolid because of low levels of susceptibility to other antimicrobials [13, 46]. In some studies, therapy with an association of at least two of the following antimicrobial agents has been reported: vancomycin, rifampin, linezolid and daptomycin [47, 48].

Resistance to imipenem by *C. striatum* isolates has been related in some countries, such as Japan [49], Spain [9, 10] and Italy [11]. Most of our *C. striatum* isolates showed resistance to imipenem (76,2%). Combination therapy that includes imipenem for the treatment of MDR *C. striatum* infections in Brazil should be more prudent.

Effective treatment of corynebacterial infections with daptomycin has been reported in the literature [48, 50]. In this study, all *C. striatum* isolates showed susceptibility to daptomycin. However, resistance to daptomycin in *C. striatum* has been documented and may occur during therapy in patients with invasive infections. Consequently, some authors recommend caution in daptomycin monotherapy for treatment of these infections [41, 51].

Some mechanisms of antimicrobial resistance have been reported in *Corynebacterium* species. Studies of the sequences encoding the A subunit of the gyrase enzyme in strains of *C. striatum*, *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium macginley* have shown that resistance to fluoroquinolones is associated with mutations of a spontaneous nature in this gene and depends on the number of mutations and the type of amino acid that was exchanged [16, 32, 52, 53]. Twenty-two isolates were resistant to the quinolones tested. The combinations of amino acids Val/Asn and Tyr/Asp in positions 87 and 91 of

QRDR region *gyrA* gene, respectively, found in three of our isolates have not been described in the literature for *Corynebacterium* species until the present moment, conferring resistance to ciprofloxacin and moxifloxacin.

The *ermX* gene (*erythromycin ribosome methylation*) encoding the rRNA methylase enzyme leads to simultaneous resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins B (MLSB) [45, 54]. This gene was found on chromosomes, plasmids and transposons of corynebacteria. We found this gene in 22 isolates, except in the MDS 2376 isolate, which may indicate that the *ermX* gene can be involved in the clindamycin and erythromycin resistance phenotype of our isolates.

Antimicrobial susceptibility studies have shown *C. striatum* isolates resistant to aminoglycosides. Consequently, the use of aminoglycosides as second-line complementary antimicrobial for treatment of *C. striatum* infections should be cautious [55, 56]. The mechanisms of aminoglycoside resistance most common are the aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) classified in 3 classes: *aac* (*acyl-coenzyme A-dependent acetyltransferase*), *ant* (*nucleoside triphosphate-dependent nucleotidyl transferases*) and *aph* (*nucleoside triphosphate-dependent phosphotransferases*). These enzymes are often disseminated by various mobile genetic elements and many aminoglycosides can be inactivated by more than one enzyme [57]. In this study, the *aph* gene was found in 22 isolates, except in the MDS 2376 isolate, but one *aph*-positive isolate showed susceptibility to gentamicin, confirmed by MIC E-test strip (MIC = 0.12 mg/L, according to BrCAST). Future analyzes of the region where the gene is located and other mechanisms of resistance to aminoglycosides in all *aph*-positive isolates should be made.

The *cmx* gene is responsible for coding the efflux protein to chloramphenicol and has already been found in transposons, plasmids and genomes of *Corynebacterium* species [58–60]. All isolates *cmx*-positive were resistant to chloramphenicol. The *cmx* gene sequence showed similarity above 99% with the sequences of *cmx* gene found in chromosomes, plasmid and genomic island of *Pseudomonas aeruginosa* and other *Corynebacterium* species deposited in GenBank/NCBI.

Biofilm is a structure that facilitates several bacterial processes influencing virulence and resistance to antimicrobials such as adhesion capacity, metabolite exchange, cellular communication, protection to antimicrobials, protection against host immune attacks. Consequently, the formation of bacterial biofilms leads to an increase in healthcare costs and extend hospitalization [61, 62]. Previously, Souza and co-workers verified that *C. striatum* PFGE profiles I to IV formed biofilm on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *C. striatum* PFGE profile I, predominant isolated from nosocomial outbreak, showed the greatest ability to adhere to all surfaces produced much

more biofilm than the other profiles [35]. In Japan, Qin and co-workers observed that all 6 *C. striatum* isolates identified as predominant PFGE profile had high ability to produce biofilm in glass cover-slips after 72 h post-incubation [15]. In the present study, biofilm formation and survival on four abiotic surfaces (glass, metal, polyurethane and silicone) were demonstrated 48 h post-incubation of bacterial cells representative of MDR *C. striatum* PFGE profiles I and II isolated from patients with bloodstream infections. Similar to *C. striatum* PFGE profile I isolated from patients undergoing endotracheal intubation procedures, PFGE profile I isolated from bloodstream and catheter-related infections also showed a higher ability to adhere to and to survive on abiotic surfaces of medical devices including those used in invasive procedures. MDR *C. striatum* viable cells were able to multiply and to produce mature biofilms on both types of catheter surfaces.

Conclusions

The ability of some *C. striatum* clones to produce biofilm on different types of abiotic surfaces may contribute to the pathogenicity favoring bacterial invasive potential and establishment of bloodstream and catheter-related infections, in addition to permanence in hospital environment and dissemination of antimicrobial resistance. The potential of *C. striatum* to cause infection should not be underestimated. Therefore, antimicrobial susceptibility testing should be performed on clinically significant *C. striatum* isolates. Medical surveillance programs should include control strategies in order to decrease potential risk factors of nosocomial infections and outbreaks due to *C. striatum*.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of Brazilian *Corynebacterium striatum* isolates from blood and catheter segments. Lane 1: λ DNA ladder PFGE marker; lane 2: profile VIII (isolate 2103); lanes 3, 5 and 6: profile I (isolates 2316, 2439 and 2023, respectively); lane 4: profile Ia (isolate 2324); lane 7: profile X (isolate 2376); lane 8: profile VIa (isolate 2390); lane 9: profile IX (isolate 2425) and lane 10: profile Ib (isolate 2454). (TIF 523 kb)

Additional file 2: Figure S2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of Brazilian *Corynebacterium striatum* isolates from blood and catheter segments. Lane 1: λ DNA ladder PFGE marker; lanes 2, 3 and 7: profile I (isolates 2089, 2091 and 2023, respectively); lane 4: profile V (isolate 2130); lanes 5, 6 and 9: profile VI (isolates 2228, 2230 and 2237, respectively); lane 8: profile VII (isolate 2296) and lane 10: profile IV (isolate 1954 – control). (TIF 469 kb)

Abbreviations

CFU: Colony-forming unit; CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute; CVC: Central venous catheter; HMI: Hospital Municipal de Jesus; HUPE: Hospital Universitário Pedro Ernesto; ICU: Intensive care unit; MDR: Multidrug-resistant; MDS: Multidrug-susceptible; MIC: Minimum inhibitory concentration; MLSB: Macrolides, lincosamides and streptogramins B; PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis; QRDR: Quinolone-resistance

determinant region; UERJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; UPGMA: Unweighted-pair group method using average linkages

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

JNR, ALMG and WW conceived and designed the study. JNR collected and identified the clinical isolates. JNR and JFCV conducted the experiments of PFGE. JNR and ECS conducted the antimicrobial assays. CS, YVF, SHS and LOM conducted the experiments of biofilm. JNR, PVPB, JFCV and WW analysed the data. JNR, WW, ALMG and RHJ drafted the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Funding

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 provided stipend for the doctoral work of Juliana Nunes Ramos and Cassius Souza in Fundação Oswaldo Cruz and Universidade do Estado do Rio de Janeiro, respectively. This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fiocruz covering laboratory reagents to perform all experiments. The Sub-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR-2/UERJ) provided stipend to Paulo Victor Pereira Baio and Yuri Vieira Faria. The funders had no role in study design, data collection, analysis and interpretation of this work.

Availability of data and materials

All data generated of analyses during this study are included in this published article and its additional files. The datasets including sequencing data used and analyzed during the current study are deposited in the GenBank. GenBank accessions for *C. striatum* 16S rRNA and *mpoB* genes were deposited: KJ934779 to KJ934789, KM001910 to KM001914, KJ855309 to KJ855313, KR010627 to KR010645, KR020513 and KR020514. *C. striatum* ATCC 6940 (GenBank accession number AY559038) All sequences of QRDRs region *gyrA* gene were deposited in GenBank/NCBI under numbers MG010347-MG010369.

Ethics approval and consent to participate

This study was developed in compliance with the Brazilian Government's Ethical Guidelines for research involving human beings (resolution of the National Health Council/Ministry of Health) and approved by the ethical research committee of Hospital Universitário Pedro Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CAAE: 01247512.3.0000.5259). The consent to participate was not required because all the investigated isolates were taken as a part of standard care (diagnostic purposes). The samples were not collected for research purposes.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Centro Colaborador e Referência para pesquisa de Difteria/Ministério da Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil. ²Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, INCCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. ³Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED), Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Pavilhão Cardoso Fontes, 10 andar, sala 17, Mangueiras, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil. ⁴Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Laboratório de Bacteriologia e Imunologia Clínica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 14 May 2018 Accepted: 17 July 2019

Published online: 29 July 2019

References

- Chandran FL, Puthukkūchal DR, Suman E, Mangalore SK. Diphtheroids-important nosocomial pathogens. *J Clin Diagn Res*. 2016;10DC28–31.
- Collada M, Rico Nieto A, Díaz de Bustamante Ussia M, balsa Criado a. Septic arthritis in a native knee due to *Corynebacterium striatum*. *Rheumatol Clin*. 2017;17:30033–5.
- Severo CB, Guazzelli LS, Barra MB, Hochhegger B, Severo LC. Multiple pulmonary nodules caused by *Corynebacterium striatum* in an immunocompetent patient. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2014;56:89–91.
- Verma R, Kavitz G. *Corynebacterium striatum* empyema and osteomyelitis in a patient with advanced rheumatoid arthritis. *BMJ Case Reports*. 2016. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-214691>.
- Yoo G, Kim J, Uh Y, Lee HG, Hwang GY, Yoon KI. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* bacteremia: first case in Korea. *Ann Lab Med*. 2015;35:472–3.
- Daisuke U, Oishi T, Yamane K, Terada K. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with a catheter-related blood stream infection. *Case Rep Infect Dis*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2682149>.
- Hascoet S, Mauri L, Claude C, Fournier E, Lourtet J, Riou JY, et al. Infective endocarditis risk after percutaneous pulmonary valve implantation with the melody and sapien valves. *JACC Cardiovasc Interv*. 2017;10:510–7.
- Poojary I, Kurian A, AJ V, Devapriva JD, AT M. *Corynebacterium* species causing breast abscesses among patients attending a tertiary care hospital in Chennai, South India. *Infect Dis (Lond)*. 2017;6:1–4.
- Gomila M, Renom F, Gallegos Mdell C, Garau M, Guerreiro D, Soriano JB, et al. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. *BMC Microbiol*. 2012;4:1–8.
- Renom F, Gomila M, Garau M, Gallegos MD, Guerrero D, Lalucat J, et al. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New Microbes New Infect*. 2014;2:106–14.
- Campanile F, Carretto E, Barbarini D, Grigis A, Falcone M, Goglio A, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains. *Italy Emerg Infect Dis*. 2009;15:75–8.
- Baio PVP, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'anna LO, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:23–9.
- Verroken A, Bauraingm C, Deplano A, Bogaerts P, Huang D, Wauters G, et al. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:44–50.
- Wang J, Du X, Cui J, Guo S, Fu Q, Wang Y, et al. Drug susceptibility and homologous analysis on *Corynebacterium striatum* strains isolated from inpatients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2014;94:2501–5.
- Qin L, Sakai Y, Bao R, Xie H, Masunaga K, Miura M, et al. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures from hospitalized patients in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2017;70:152–7.
- Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*. 2017;7:1.
- Fernández-Guenero ML, Robles J, Nogales MC, Nuevo D. *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial drug-resistant endocardial pathogen. *J Heart Valve Dis*. 2013;22:428–30.
- Wang J, Wang Y, Du X, Cui J, Wang K, Zhang L, et al. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(12):1299–305.
- Yanai M, Ogasawara M, Hayashi Y, Suzuki K, Takahashi H, Satomura A. Retrospective evaluation of the clinical characteristics associated with *Corynebacterium* species bacteremia. *Braz J Infect Dis*. 2018;22(1):24–9.
- Kimura S, Gomyo A, Hayakawa J, Akahoshi Y, Harada N, Ugai T, et al. Clinical characteristics and predictive factors for mortality in coryneform bacteria bloodstream infection in hematological patients. *J Infect Chemother*. 2017; 23(3):148–53.
- Ishiwada N, Watanabe N, Murata S, Takeuchi N, Taniguchi T, Igarai H. Clinical and bacteriological analyses of bacteremia due to *Corynebacterium striatum*. *J Infect Chemother*. 2016;22(12):790–3.

22. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*. 1977; 296:1305–9.
23. Funke G, Bernard KA. *Coryneform gram-positive rods*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Tenover FC, White O, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. USA: ASM Press; 2011. p. 413–42.
24. Yoon S, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
25. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233–9.
26. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haegman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(Suppl 3):1–46.
27. Luo Y, Ma Y, Zhao Q, Wang L, Guo L, Ye L, et al. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):4002–7.
28. BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. In: *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. 08/26/2017 version. Brazil: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2017.
29. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI supplement M100S. 26th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne; 2017.
30. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. In: CLSI supplement M45-A2. 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne; 2010.
31. Magioranos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268–81.
32. Sierra JM, Martínez-Martínez L, Vázquez 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*. 2005;49:1714–9.
33. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:4876–82.
34. Ortiz-Pérez A, Martín-de-Hijas NS, Esteban J, Fernández-Natal M, García-Cía JJ, Fernández-Roblas R. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb Drug Resist*. 2010;16:273–7.
35. Souza C, Faria YV, Sant'Anna LO, Viana VG, Seabra SH, Souza MC, et al. Biofilm production by multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:242–8.
36. Aslam B, Wang W, Arshad M, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1645–58.
37. Chen FL, Hsueh PR, Teng SO, Ou TY, Lee WS. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012;45:255–8.
38. Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro. *Braz J Microbiol*. 2003;34:39–44.
39. Martins CAS, Faria L, Souza M, Camello T, Velasco E, Hirata R Jr, et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:905–13.
40. Superti SV, Martins DS, Gaiério J, Soares F, Prochnow T, Cartarelli VV, et al. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2009;51:115–6.
41. McElvania TeKippe E, Thomas BS, Ewald GA, Lawrence SJ, Burnham CA. Rapid emergence of daptomycin resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum*... a cautionary tale. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:2199–205.
42. Iwalokun BA, Oluwadun A, Akinsinde KA, Niemogha MT, Nwaokorie FO. Bacteriologic and plasmid analysis of etiologic agents of conjunctivitis in Lagos, Nigeria. *J Ophthalmol Inflamm Infect*. 2011;1:95–103.
43. Beltrán-Arroyave C, Díaz-Díaz A, Loaiza-Díaz N. Osteomielitis crónica por *Corynebacterium striatum* en una adolescente. *Rev Chil Infectol*. 2016;33:696–9.
44. Das S, Subba Rao AV, Sahu SK, Shama S. *Corynebacterium* spp. as causative agents of microbial keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2016;100:939–43.
45. Olender A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSb) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy*. 2013;59:294–306.
46. Crabtree JH, García NA. *Corynebacterium striatum* peritoneal dialysis catheter exit site infection. *Clin Nephrol*. 2003;60:270–4.
47. Tarr PE, Stock F, Cooke RH, Fedoriko DP, Lucey DR. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2003;5:53–8.
48. Shah M, Murillo JL. Successful treatment of *Corynebacterium striatum* endocarditis with daptomycin plus rifampin. *Ann Pharmacother*. 2005; 39:1741–4.
49. 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*. 2006;54:109–14.
50. Fernández-Guerrero ML, Molins A, Rey M, Romero J, Gadea I. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* endocarditis successfully treated with daptomycin. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40:373–4.
51. 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*. 2016;22:233–7.
52. Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, Nakayama-Iraoishi H, Ichimura M, Hayashi T, et al. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol*. 2008;46:527–32.
53. Yoon S, Kim H, Lee Y, Kim S. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean J Lab Med*. 2011;31:47–8.
54. Fernández-Natal I, Sáez-Nieto JA, Rodríguez-Lázaro D, Valdezate-Ramos S, Parras-Padilla T, Medina MJ, et al. Phenotypic, molecular characterization, antimicrobial susceptibility and draft genome sequence of *Corynebacterium argentoratense* strains isolated from clinical samples. *New Microbes New Infect*. 2016;10:116–21.
55. Navas J, Fernández-Martínez M, Salas C, Cano ME, Martínez-Martínez L. Susceptibility to aminoglycosides and distribution of *aph* and *aac(3)-II* genes among *Corynebacterium striatum* clinical isolates. *PLoS One*. 2016;11:12.
56. 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*. 2018;62(4):e01776–17.
57. Shi K, Caldwell SJ, Fong DH, Berghuis AM. Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:1–22.
58. Tauch A, Trost E, Tilker A, Ludewig U, Schneiker S, Goessmann A, et al. The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *J Biotechnol*. 2008;136:11–21.
59. Schroder J, Maus I, Meyer K, Wordemann S, Blom J, Jaenicke S, et al. Complete genome sequence, lifestyle, and multidrug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*. 2012;13:141.
60. Mollmann S, Albersmeier A, Ruckert C, Tauch A. Complete genome sequence of *Corynebacterium imitans* DSM 44264, isolated from a five-month-old boy with suspected pharyngeal diphtheria. *Genome Announc*. 2014. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01210-14>.
61. Paredes J, Alonso-Arce M, Schmidt C, Valderas D, Sedano B, Legarda J, et al. Smart central venous port for early detection of bacterial biofilm related infections. *Biomed Microdevices*. 2014;16:365–74.
62. Donelli G, Vuoitto C. Biofilm-based infections in long-term care facilities. *Future Microbiol*. 2014;9:175–88.

Publisher's Note

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

4.5 Artigo 5 – Tolerance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum* (Artigo submetido)

Artigo 5 – Tolerance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum*

Autores: Cassius Souza, Fellipe de Oliveira Cabral, Higor Franceschi Mota, Yuri Vieira Faria, Lincoln de Oliveira Sant’Anna, Prescilla Emy Nagao, Rafael Silva Duarte, Cintia da Silva Santos, Lílian Oliveira Moreira, Ana Luíza Mattos-Guaraldi^{1*} (Qualis A4).

Revista: Antimicrobial Drug Resistance (2019): Submetido em Jun de 2019.

Resumo

A desinfecção e a antissepsia são de grande importância no controle de infecções incluindo surtos hospitalares causados por patógenos que expressam multiresistência a agentes antimicrobianos (MDR) utilizados na terapia. Atualmente, as infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS) causadas por amostras multirresistente (MDR) e Multissensível (MDS) de *Corynebacterium striatum* não devem ser subestimadas, principalmente as oriundas de pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos. Estudos descrevendo o potencial de virulência de *C. striatum* necessitam de mais investigação. No presente estudo formas planctônicas e / ou sésseis de quatro amostras de *C. striatum* de diferentes tipos de PFGE foram tratadas com biocidas seguindo normas e recomendações do fabricante: Glutaraldeído 2% (GA), ácido peracético 2% (PA), Virkon® 1% (VK), hipoclorito de sódio 1% (SH) e álcool etílico 70% (ET). Também foram realizados ensaios time-kill utilizando albumina de soro bovino 2% (BSA) para avaliação da influência da matéria orgânica nos efeitos dos biocidas. As formas planctônicas expressaram tolerância ao GA em diferentes níveis. A viabilidade de *C. striatum* foi observada por até 2, 4, 20 e 30 min para as amostras tratadas com GA, os biocidas PA, VK24h, SH e ET tiveram efeitos de longo alcance na mortalidade bacteriana. No entanto, o armazenamento de VK (48h) reduziu sua atividade biocida para *C. striatum*. Além disso, biofilmes maduros foram produzidos em substratos abióticos, incluindo superfícies de aço. Após o tratamento com GA (30 min), a sobrevivência das formas sésseis foi 100% maior do que as formas planctônicas em todas as amostras de *C. striatum* testadas. Independente dos biocidas testados, BSA aumentou a sobrevivência das formas planctônicas e sésseis ($p < 0,005$). Os resultados obtidos indicam que as equipes médicas e laboratoriais devem estar atentas para a disseminação e controle IRAS por *C. striatum* que apresenta tolerância aos biocidas, incluindo desinfetantes de alto nível, como a GA.

Microbial Drug Resistance

Mechanisms, Epidemiology, and Disease

Microbial Drug Resistance: <http://mc.manuscriptcentral.com/mdr>

Tolerance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum*

Journal:	<i>Microbial Drug Resistance</i>
Manuscript ID:	MDR-2019-0124.R1
Manuscript Type:	Disease
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Souza, Cassius; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ Cabral, Felipe; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ Mota, Higor; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ Faria, Yuri; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ Nagao, Prescilla ; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biologia Celular. Sant'Anna, Lincoln; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ Duarte, Rafael; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo Góes - UFRJ Santos, Cintia; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ Moreira, Lillian; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia - UFRJ Mattos-Guaraldi, Ana Luiza; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ</p>
Keyword:	Resistance, Microbial Drug Resistance, Infections, Antimicrobial, Pathogenic bacteria
Manuscript Keywords (Search Terms):	<i>Corynebacterium striatum</i> , Tolerance, biofilm, antibiotic resistance, nosocomial outbreak, planktonic

Tolerance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum*

Cassius Souza, Fellipe de Oliveira Cabral¹, Higor Franceschi Mota¹, Yuri Vieira Faria¹, Driely, Lincoln de Oliveira Sant'Anna, Prescilla Emy Nagao, Rafael Duarte, Cintia da Silva Santos, Lílian Oliveira Moreira, Ana Luíza Mattos-Guaraldi^{1*}

¹Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas; Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance/The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health-FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/UERJ; ² Universidade do Estado do Rio de Janeiro -Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biologia Celular; ³Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Microbiologia Paulo Goes da - UFRJ -RJ, Brazil; ⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro - Faculdade de Farmácia – UFRJ.

Keywords: *Corynebacterium striatum*, biocides, biofilm, glutaraldehyde, nosocomial outbreak, tolerance

Running title: Biocides tolerance by *Corynebacterium striatum*

Correspondence: **Prof. Dr. Ana Luíza de Mattos Guaraldi**

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

Phone: +55 21 2868-8280; Fax: +55 21 2868-8376; E-mail: aguaraldi@gmail.com

Abstract (250 words)

Disinfection and antisepsis are of primary importance in controlling nosocomial infections and outbreaks by pathogens expressing multiple resistance to antimicrobial agents (MDR) used in therapy. Nowadays, infections related to health services (HAIs) due to MDR-resistant and MDS-susceptible *Corynebacterium striatum* should not be underestimated, including patients using invasive medical devices. Virulence potential of *C. striatum* needs further investigation. Presently, susceptibility profiles of planktonic and/or sessile forms of four *C. striatum* strains of different PFGE-types were examined to biocides based on manufacturer's recommendations: 2% Glutaraldehyde (GA), 2% Peracetic acid (PA), 1% Potassium monopersulfate (Virkon[®];VK), 1% Sodium hypochlorite (SH) and 70% Ethyl alcohol (ET). Time-kill assays using 2% bovine serum albumin (BSA) were performed for evaluation of influence of organic matter on biocides effects. Planktonic forms expressed GA-tolerance at different levels. *C. striatum* viability was observed until 2, 4, 20 and 30 min for MDR 2369/II, MDS 1954/IV, MDR 1987/I and MDS 1961/III strains, respectively. In contrast to GA, the biocides PA, VK24h, SH and ET had higher effective bacterial mortality. However, storage of VK (48h) reduced their biocide activities. Moreover, mature biofilms were produced on abiotic substrates, including steel surfaces. Post-treatment with GA (30 min), survival of sessile forms was $\geq 100\%$ than planktonic forms of all *C. striatum* tested strains. Independent of biocides tested, BSA increased survival of planktonic and sessile forms ($p \leq 0.005$). Present data indicated that hospital staff should be aware of dissemination and eradication of HAIs by *C. striatum* presenting tolerance to biocides, including high-level disinfectants, such as GA.

Introduction

Corynebacterium spp. is widely disseminated in the environment and can colonize the skin and mucous membranes of humans as part of the normal microbiota [1]. Because of these characteristics, as well as challenges in its identification, *Corynebacterium* spp. remain frequently considered as contaminants in clinical microbiological laboratories and also by health professionals in many countries [1]. Multidrug-resistant (MDR) and multi-susceptible (MDS) *C. striatum* strains have been reported with increased frequency as a pathogen of severe nosocomial infections and outbreaks in both industrialized and developing countries, such as Spain [2-3], Italy [4], Brazil [5], Belgium [6], China [7], Japan [1], Tunisia [8] and Switzerland [9]. In a Brazilian tertiary care hospital located at Rio de Janeiro metropolitan area, a nosocomial outbreak caused mostly by MDR *C. striatum* predominantly isolated from tracheal aspirates samples was initially verified in 2009 [5]. Subsequently, cases of bloodstream and catheter-related infections caused by *C. striatum* isolates were noticed in the same hospital. Different studies have increasingly recognized *C. striatum* as pathogen related to varied nosocomial infections including, respiratory tract and urinary infections, surgical wounds, prosthetic joint infections, blood stream infection associated with a catheter-related [5, 10-12], bacteremia, endocarditis [13-14] osteomyelitis [15], meningitis, and infections of patients making use of medical devices, in both immunocompetent and immunocompromised hosts (16). Nosocomial spread of MDR *C. striatum* strains, especially in long-term hospitalized patients with prolonged exposure to broad-spectrum antibiotics and admitted in intensive care units (ICU) and surgical wards using continuous and prolonged medical devices and/or respiratory recuperation [5, 17-21]. Accordingly, the pathogenicity of *C. striatum* should not be underestimated and the virulence factors that support *C. striatum* infections related to the health service (HAIs) need further investigation. The ability of *C. striatum* survival and biofilm formation on abiotic surface of varied types, including indwelling medical devices was recently verified [22-23]. The use of indwelling medical devices may facilitate colonization and infection by *C. striatum* due to biofilm formation and subsequent invasive dissemination of this pathogen [5, 12, 13, 15, 22]. Previous studies already suggested the relationship between biofilm formation ability, changes in genes and consequently increased resistance to drugs [5, 6, 15, 17, 24-27]. Accordingly, enhanced surveillance and control strategies remain necessary to decrease MDR and MDS *C. striatum* infections and outbreaks in hospitals.

Biocides have been extensively used in hospitals and other healthcare settings for the disinfection and sterilization of medical devices and surfaces. In particular, disinfectants play

an essential role in infection control and prevention of transmission of human pathogens. However, tolerance to biocides has been previously described for several MDR nosocomial pathogens, including *Mycobacterium* spp. and *Staphylococcus aureus* [28-31]. For these pathogens studies have also verified correlation between susceptibility to biocides and antimicrobial resistance among hospital-acquired and community-acquired strains. Investigations have been also directed towards the responses of microorganisms to biocides and effects of antimicrobial agents on surface-attached communities [4, 17, 32-34].

Biofilm formation may facilitate colonization and infections and lesions of human epithelial surfaces that, independent of antibiotic pressure, *C. striatum* strains may get invasive favored by the presence of invasive of medical devices, including, catheters and endotracheal tubes. Since some foreign materials, are previous submitted to high level disinfection, if not used adequate procedures and antimicrobial agents contamination of patients by foreign materials also possibility [3, 5, 6, 7, 22, 35]. In this study we assessed the susceptibility of planktonic and biofilm-associated forms of *C. striatum* strains to different biocidal products currently used in healthcare facilities.

Materials and Methods

Bacterial strains – **Table 1** shows the epidemiological and microbiological features of the partially studied *C. striatum* strains used in this investigation while *C. striatum* strains in *physiological saline solution* (0.85% NaCl) *without biocides* were used as negative-controls of experiments [5].

Resistant profile of MDR *C. striatum*

Susceptibility testing - Antimicrobial susceptibility profiles were determined by the disk diffusion method in cation-adjusted Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood. Breakpoints for the susceptible strains were used as suggested by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) for bacteria excluded from tables 2A-K. As there is not yet a defined standard for interpreting these results, the standard proposed in CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7) was used (CLSI 2007). The breakpoints for *S. aureus* were considered in the cases of penicillin, oxacillin and ampicillin. For the other antimicrobial agents, we used the breakpoints for other microorganisms, but not *Haemophilus* spp. or *Neisseria gonorrhoeae*, which had been validated by previous studies. Intermediate results were considered resistant [36-37]. The antibiotics (Oxoid SA, Spain) tested included penicillin (10 U), ampicillin (30 µg), methicillin (5 µg), cefotaxime (30 µg), cefepime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), imipenem (10

µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), linezolid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), moxifloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), rifampin (5 µg), fosfomicin (200 µg), vancomycin (30 µg), mupirocin (200 µg), tobramycin (10 µg), nitrofurantoin (300 µg) and ticarcillin/clavulanate (75 µg/10 µg). *C. striatum* strains presenting resistance to more than three different classes of antibiotics were classified as MDR as previously defined by Magiorakos and co-workers (2012) [38].

Time - kill assays against *C. striatum* planktonic cells and effects of organic matter on biocides activities. Bactericidal effects of biocides on planktonic forms of *C. striatum* strains were evaluated by the standard time-kill method on 24-well flat-bottomed polystyrene microtiter plates (NUNC™) [39]. The list of biocides and neutralizers is shown in **Table 2**. Briefly, microorganisms were previously cultured in TSB medium at 37°C for 48h. Aliquots of 1mL of bacterial suspension (OD= 0.2 at $\lambda= 570$ nm; 1.5×10^8 CFU mL⁻¹) were centrifuged and the pellets were resuspended in 900µL of biocides or sterile distilled water (control). High-level biocides 2% glutaraldehyde (2% GA) (Vetec Química Fina Ltda) and 2% peracetic acid (2% PA) (Sekusept Aktiv Ecolab Deutschland GmbH); intermediate-level biocides 1% sodium hypochlorite (1% SH) (Cinord Sudeste Quimica) and 1% potassium peroxymonosulfate (Virkon® - VK24h or VK48h) (EPA Label); low-level biocide, 70% ethyl alcohol (70% ET) (Vetec Química Fina Ltda) were tested. Biocide concentrations were chosen based on manufacturer's recommendations for disinfection procedures.

At specified contact time (0.25 to 30 min) with biocides at 22°C, 100µL of bacterial suspensions were ferried into 900µL of correspondent sterile neutralizing solutions. After serial dilution in phosphate buffered saline (PBS) 0.1 M pH 7.2, microbial suspensions were plated on to Trypticase Soy agar (TSA) medium and incubated at 37°C for 48h. The number of viable bacteria was valued by colonies forming units (CFU mL⁻¹). The efficacy of each biocide on planktonic forms was evaluated based on the minimum incubation time to completely eliminate bacterial growth and the lower number of CFU mL⁻¹ counts observed [39].

In order to evaluate the influence of organic matter on biocides effects, time-kill assays using 2% bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) were performed based on Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity [39].

C. striatum strains in *physiological saline solution* (0.85% NaCl) *without biocides* were used as negative-controls of experiments [39].

Effect of 2% GA and 2% BSA on bacterial sessile forms associated to biofilm.

Investigation was performed using the following abiotic substrates lodged into 24-well flat-bottomed polystyrene microtiter plates: (i) 13 mm glass coverslips (Sigma-Aldrich), (ii) sterile 0.5 cm segments of polyurethane catheters (16-gauge percutaneous nephrostomy catheters Intracath; Deseret Pharmaceutical Co, USA) (iii) 13mm thermanox coverslips (NUNC™) and (iv) sterile 0.5cm segments of metal parts of catheters (16-gauge percutaneous nephrostomy catheters Intracath; Deseret Pharmaceutical Co, USA). The quantification of bacteria associated to biofilm was determined by biofilm sand abrasion and culture as previously described by Souza and co-workers (2015). Briefly, each abiotic substrate was incubated with 10^8 CFU mL⁻¹ of bacterial suspension that was mixed with 500μL TSB and incubated for 48h at 37°C, to allow biofilm formation. Subsequently, supernatants were removed and biofilms were washed three times with PBS. After that, each well was added of 2% GA solution with or without 2% BSA and incubated at room temperature for 30 min. Wells with PBS were used as negative-controls. After that, substrates were rinsed 3 times with 1% sodium sulfite neutralization solution and 3 times with PBS pH 7.2, then removed from the 24-well plate and placed into individual glass tubes (18 x 100cm) containing 1000μL PBS 0.1 M pH 7.2 plus 1g of sterile sand(150-212 μm; Sigma Aldrich Co.). The tubes were then agitated with a vortex mixer for 1 min and 100μL of the suspension was diluted and plated for CFU quantification.

Scanning electron microscopy (SEM) assays.

Effects of 2% GA on biofilm formation were evaluated by SEM. Briefly, sections of polyurethane catheters were fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated in a graded series of ethanol. Subsequently, catheter segments were subjected to critical point drying with carbon dioxide, covered with a 10 nm layer of gold palladium and examined with a JEOL JSM 5310 scanning electron microscope. Sterile polyurethane catheters (negative control) were also processed by SEM directly upon removal from commercial packaging [22].

Statistical analysis. Each experiment was carried out in triplicate and repeated three times. Student's t test was used to compare means of experiments; $p < 0.05$ and/or $p < 0.001$ were considered statistically significant.

Results

Phenotypic and genotypic properties and antimicrobial susceptibility profiles of *C. striatum* clinical isolates

Epidemiological and microbiological features of *C. striatum* strains previously isolated from patients of a University hospital at the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil used in this study (**Table 1**) showed MDR profiles for strains 1987/I – BAL and 2369 /II - tracheal aspirate that were susceptible only to vancomycin, linezolid and tetracycline. Two other strains (1954/IV surgical wound isolate and 1961/III urine isolate) were susceptible to most of the tested drugs (MDS) except mupirocin, fosfomycin and ticarcillin/clavulanate. Deaths occurred only in patients from whom MDR *C. striatum* strains were isolated in the blood, CFS, BAL and/or tracheal aspirate.

Bactericidal effects of biocides and influence of organic matter on survival /tolerance of planktonic forms.

Data displayed in **Figure 1** and **Table 3** showed the effects of 2% GA and 2% PA on planktonic forms of MDR and MDS *C. striatum* strains. All four *C. striatum* strains of different PFGE-types were found tolerant to 2% GA, but at different levels. All strains showed tolerance up to two minutes of treatment with GA. Bacterial viability was observed until 2, 4, 20 and 30 min of treatment with GA for the strains MDR 2369/II, MDS 1954/IV, MDR 1987/I and MDS 1961/III, respectively. For the MDR 1987/I strain, a gradually reduction of viable cells was observed over time, however MDS 1954/IV strain presented similar CFU counts from 0.25 to 4 min, while for the MDR 2369/II strain an increase at CFU counts at 1min was observed. Interestingly, for the MDS 1961/III strain, the number of CFU reduced after 0.25 and 0.5 min of incubation with 2% GA, but it increased gradually from 1 to 20 min and decreased at 30 min. The presence of 2% BSA increased the number of viable cells for most of *C. striatum* strains. BSA increased the ability of MDR 2369/II and MDS 1954/IV strains to survive until 20 and 10 min, respectively (**Figure 1**).

In contrast to GA, 2% PA had a far-reaching effect on bacterial mortality (**Figure 1**). MDR 1987/I and MDS 1954/IV strains were able to survive for 0.25 min, while MDR 2369/II and MDS 1961/III strains survived for 0.5 and 1 min, respectively. The presence of 2% BSA was able to increase the CFU count of the strain 1987 at 0.25 ($p=0.005$) and 0.5 min ($p=0.05$). However, no significant difference was observed for MDS 1961/III, MDR 2369/II and MDS 1954/IV strains, although the presence of BSA increased the tolerance of MDS 1961/III strain from 1 to 4 min (**Figure 1**).

Data displayed in **Figure 2** and **3** and **Table 3** showed bactericidal effects of the disinfectants and/or antiseptics 1% sodium hypochlorite (SH), VIRKON® (VK) and 70% ethanol (70%ET) and the influence of organic matter on planktonic forms of *C. striatum* strains. Tolerance to 1% SH was observed for MDR and MDS strains: MDR 1987/I, MDR 2369/II and MDS 1954/IV strains until 0.25 min and for MDS 1961/III strain until 1min. The presence of 2% BSA significantly increased ($p \leq 0.005$) the tolerance to 1% SH of MDS 1961/III strain quantitatively (at 0.25, 0.5 and 1 min) and survival time (until 2 min).

Results also showed the effects of commercial formula of potassium monopersulfate - 1% VK freshly prepared and used at the same day and after stock for 48h (VK48h) on survival/tolerance of planktonic forms of all *C. striatum* tested strains. Higher tolerance to freshly prepared 1% VK was shown for MDR 1987/I and 1961/III strains survived until 0.5 and 2 min, respectively. The presence of 2% BSA was able to increase the tolerance of MDR 1961/III strain from 2 to 4 min and for MDS 1954/IV strain from 0.25 to 0.5 min. However, the storage of VK solution for 48h (VK48) reduced its biocide activity in all opportunities: bacterial survival was observed for the strains MDR 2369/II and MDR 1961/III until 4 min of incubation while for MDR 1987/I and MDS 1954/IV strains CFU were detected until 2 and 0.25 min, respectively. The presence of 2% BSA significantly increased survival in VK48 of planktonic forms of all strains tested, especially MDR 2369/II (from 4 to 10 min) and MDS 1961/III strains (from 4 to 20 min) (**Figure 2**).

For 70% ET, MDS 1961/III strain survived until 1min and MDR 1987/I, MDR 2369/II and MDS 1954/IV strains were able to survive until 0.5 min. Interestingly, the presence of 2% BSA increased time of survival of all *C. striatum* strains, specially MDS 1961/III strain until 30 min. Although, the presence of BSA decreased bacterial survival at 0.25 min for MDS1961/III strain, this organic matter significantly increased bacterial viability of planktonic forms at 0.25 min for MDR 1987/I and MDS1954/IV strains ($p=0.005$) (**Figure 3**).

Effects of 2% GA and 2% BSA on mature biofilm produced by *C. striatum* strains

Data displayed in **table 4** and **figure 4** indicated that all four MDR and MDS *C. striatum* strains of different PFGE-types were found capable to produce mature biofilm (48h) on steel surface in addition to abiotic surfaces of glass, polyurethane and polystyrene, but at different levels. Biofilms produced on these abiotic hydrophilic and positively-charged (steel, glass and polyurethane) and hydrophobic and negatively-charged (polystyrene) surfaces were treated for 30 min with 2% GA added or not of 2% BSA. Experiments with MDS 1961/III (urine) followed by MDR 1987/I (BAL) strains showed higher number of viable sessile bacterial cells recovered

from biofilm formation a steel surfaces while MDR 1987/I strain showed a higher number of viable sessile bacterial cells recovered from biofilm formation on glass, polyurethane and especially polystyrene surfaces. Lowest ability formation on all abiotic surfaces tested was observed for both 2369/II (tracheal aspirate) and 1954/IV (surgical wound), independent of antimicrobial susceptibility profiles. Sessile bacterial forms of mature biofilms (48h) produced on steel, glass, polyurethane and polystyrene surfaces by all four MDR and MDS *C. striatum* strains of different PFGE-types were found capable to survive post treatment for 30 min with 2% GA, considered as a high level disinfectant, although in this treatment conditions GA was found able to kill all planktonic forms and to eliminate most of *C. striatum* strains, excepted MDS 1961/III. In addition to bacterial protection due to biofilm production, the presence of organic matter (2% BSA) was able to increase survival of *C. striatum*, depending on the properties of strains and/or abiotic surfaces.

Bacterial recovery from glass formed biofilm, without 2% GA varies but bacterial recovery was at least of 1.0×10^7 CFU. After 2% GA treatment, the number of CFU reduced significantly, varying from 0.008% to 0.21%. Interestingly, 2% GA did not eliminate any sessile bacterial strain associate to biofilm. The CFU number recovered after 2% GA treatment was MDS 1954/IV (2.33×10^3) < MDR 2369/II (8.0×10^3) < MDS 1961/III (8.33×10^3) < MDR 1987/I (8.67×10^3). The presence of BSA was able to increase bacterial survival in all strains tested at least 150%.

Bacterial recovery from steel formed biofilm, without 2% GA varies but bacterial recovery was at least of 1.0×10^7 CFU except for the strain MDR 2369/II which bacterial recovery was 3.0×10^5 CFU. After 2% GA treatment, the number of CFU reduced significantly, varying from 0.04% to 6.0%. The CFU number recovered after 2% GA treatment was MDS 1961/III (7.5×10^4) > MDR 1987/I (2.5×10^4) > MDR 2369/II (1.8×10^4) > MDS 1954/IV (7.0×10^3). Moreover, the presence of BSA was able to increase bacterial survival in all strains tested at least 106%.

Bacterial recovery from thermanox formed biofilm, without 2% GA varies but bacterial recovery was at least of 1.2×10^7 CFU. After 2% GA treatment, the number of CFU reduced considerably, varying from 0.085% to 0.542%. The CFU number recovered after 2% GA treatment was MDS 1954/IV (8.0×10^4) > MDS 1961/III (6.5×10^4) > MDR 2369/II (2.0×10^4) > MDR 1987/I (1.1×10^4). The presence of BSA was able to increase bacterial survival in all strains tested at least 118% (**table 4**).

Bacterial recovery from polyurethane formed biofilm, without 2% GA varies but bacterial recovery was at least of 1.2×10^7 CFU. After 2% GA treatment, the number of CFU

reduced significantly, varying from 0.085% to 0.542%. The CFU number recovered after 2% GA treatment was MDS 1954/IV (8.0×10^4) > MDS 1961/III (6.5×10^4) > MDR 2369/II (2.0×10^4) > MDR 1987/I (1.1×10^4). The presence of BSA was able to increase bacterial survival in all strains tested at least 125% (**table 4**).

Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron micrographs displayed in **Figure 4** illustrate the effects of biocides on morphological features of biofilm arrangements of MDR and MDS *C. striatum* strains of different PFGE-types formed on abiotic surfaces. Biofilm was present in all conditions tested. Before and after treatment with 2% glutaraldehyde solution (30 min) large amount of biofilm material on polyurethane catheter surfaces (48h) was observed for all four strains tested. The presence of autoaggregative microcolonies, extracellular slime and hollow voids on the polyurethane surface were indicative of mature biofilm structure. It was also observed that in *C. striatum* biofilm the presence of glutaraldehyde, a high number of elongated sessile bacterial cells were present, which may indicate an adaptation response of the pathogen to stress conditions with important implications for persistence and dissemination of *C. striatum* in nosocomial environment.

Discussion

Antiseptics and disinfectants are used extensively in hospitals and other health care settings for a variety of topical and hard-surface applications. In particular, they are an essential part of infection control practices and aid in the prevention of nosocomial infections [34-35]. A wide variety of active chemical agents have been used as biocides for hundreds of years for antiseptics, disinfection, and preservation [34-35]. Despite this, less is known about the mode of action of biocides than about antibiotics. In general, biocides have a broader spectrum of activity than antibiotics, and, while antibiotics tend to have specific intracellular targets, biocides may have multiple targets. The widespread use of antiseptic and disinfectant products has prompted some speculation on the development of microbial resistance, in particular cross resistance to antibiotics [34-35, 40-45]. Disinfection and sterilization are essential for ensuring that medical and surgical instruments do not transmit infectious pathogens to patients, medical professionals and/or nosocomial environment. Failure to properly disinfect or sterilize equipment carries not only risk associated with breach of host barriers but also risk for person-to-person transmission and transmission of environmental pathogens [40-45].

Sessile forms of bacteria associated to biofilm are usually more resistant to killing than bacteria growing under planktonic conditions [28]. Bacterial biofilms play an important role at the nosocomial environment by protecting microorganisms against killing by antibiotics and biocides. Beside antimicrobial drugs, biocides seem to be important allies to eradicate not only bacteria but also biofilms since antimicrobials alone may not destroy persistent biofilm matrix [40-43,45]. Biocides have been currently used to control and inactivate biofilms although tolerance to some biocides may decrease efficacy of disinfection. Assessment of susceptibility to antiseptics and disinfectants has been increasingly investigated [40-46].

Previous studies highlighted the importance of biofilm formation for infectious potential and for tolerance to biocides of *Mycobacterium* spp. and/or other bacterial pathogens [22, 28-30]. Some pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, were found capable to adapt to environmental stresses and that favored their persistence in biofilms. This ability compromises safety of microorganisms since adhered cells can be resistant to biocides and more difficult to detect and eliminate [47]. Previous studies have demonstrated that bacterial infections acquired in nosocomial environment may be associated with medical devices, such as ventilators, catheters, sterna surgical wound wires and endotracheal tubes [4,17,48]. Interaction and persistence of MDR and MDS *C. striatum* strains with surfaces of semi-critical and critical medical devices, such as catheters and endotracheal tubes may be aided by affinity of this pathogen to abiotic hydrophilic and positively-charged and hydrophobic and negatively-charged abiotic surfaces and subsequent ability of biofilm formation. In previous study, 1987/I strain was found as the one that presented the highest ability to make biofilm on glass, polyurethane and polystyrene surfaces [22]. Presently, all *C. striatum* strains tested were able to form biofilm, independently of the substrate tested, including metal. The 1987/I strain was the most adherent since it presented the highest CFU numbers recovered from biofilm associated to most of substrates tested. Although all PFGE-types were able to form biofilm in all substrates tested, 2396/III strain was poorly adherent to metal and 1961/III strain was highly adherent to metal. The mechanisms that influence *C. striatum* ability to adhere to different abiotic surfaces at varied levels remain unknown. Since the widespread use of antiseptic and disinfectant products has prompted some investigation on the development of microbial resistance, in particular cross resistance to antibiotics, tolerance to biocides of planktonic and biofilm-associated forms of *C. striatum* was currently verified.

The presence of medical devices and the exposure to antimicrobials may possibly enable infection of human lower respiratory tract by *C. striatum*. Recently, we documented the first Brazilian nosocomial outbreak caused by MDR *C. striatum* and most of the patients presented

lower respiratory tract infection (64%) and were also receiving ventilatory support (89%). PFGE analysis confirmed the isolation of a single clone of MDR *C. striatum* (PFGE I) from lower respiratory tract [5]. However, there is little research about disinfectant efficacy on contaminated medical devices and appliances by *C. striatum*. In Japan, Wong and co-workers (2010) [48] also showed that *C. striatum* may be responsible for serious hospital-acquired respiratory infection (empyema, pneumonia or acute bronchitis) and community-acquired pneumonia. Only 50% of patients who received antibiotics active against this pathogen survived the infection. Most of the patients received ventilatory support using non-invasive ventilators and/or invasive mechanical ventilators.

Most actinomycetes are typically gram-positive, filamentous, partially acid-fast, branched bacteria that have many microbiologic characteristics in common with members of the genera *Mycobacterium* and *Corynebacterium*, in particular, on the basis of their cell wall components, their cell envelope lipid and peptidoglycan compositions. Glutaraldehyde is a saturated dialdehyde with a powerful antimicrobial agent and the most widely used high-level disinfectant. Among the effective options for the disinfection of semi critical temperature-sensitive medical devices, GA remains the most widely used chemical disinfectant in hospitals worldwide due to its effective mycobactericidal activity and relatively low cost. In Canada, directions for use on a product containing 2% GA product indicated that items to be disinfected should be immersed in it completely for a minimum of 10 min at 20°C to destroy vegetative organisms including *P. aeruginosa*; for 100% killing of *M. tuberculosis*, the contact time recommended on the label is 45 min at 25°C [49]. Recent reports suggested, however, that rapidly growing mycobacteria have been isolated with increasing frequency from GA-processed medical devices, including endoscopes, with recent *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium massiliense* outbreaks being associated with the development of resistance to GA is one of the most commonly used disinfectants in endoscopy units. It is effective and does not damage endoscopes, accessories, or automated processing equipment [17, 28-29]. Mechanistically, glutaraldehyde is thought to act by cross-linking proteins and lipids on the outer surface of the cell. Resistance to GA has been reported in several bacterial species. GA-resistant *P. aeruginosa* was recently isolated from endoscopes associated with an outbreak and was shown to acquire a resistance pattern that remained stable over several passages, indicating the involvement of genetic factors. Phenotypic adaptation, physical protective effects and genetic factors have been thought to be relevant mechanisms for GA resistance in bacterial planktonic and sessile forms [50]. There is thus some concern that the widespread use of GA in clinical settings selects for GA resistant populations of bacteria, with

possible consequences on cross-resistances to multiple antibiotics and impact on bacterial pathogenicity [51].

Although GA has been withdrawn from use in some countries [52] GA remains a biocide commonly used to control microbial growth in hospitals, water treatment, food production and industries, including Brazil [53]. Collectively, these studies suggest genetic, possibly multifactorial, regulation of GA resistance in bacteria; however, the mechanism is not clear. Given that GA is a widely used biocide, it is necessary to elucidate microbial biofilm responses to GA to inform proper biocide application. Although widely used, to best of authors' knowledge response of *C. striatum* biofilm to GA has not been previously reported. Although biofilms are often known to demonstrate increased antimicrobial resistance compared to planktonic cells to understand phenotypic adaptation, physical protective effects mechanism basis of GA resistance we demonstrated the effect of GA exposure on *C. striatum* planktonic forms and biofilm. High-level disinfection procedures experiments showed that exposure to 2% GA during 30 min significantly reduced the number of viable bacteria associated to biofilm in all substrates tested. However, survival of sessile forms was at least 100% higher than planktonic forms of *C. striatum*. GA tolerance was observed for planktonic and sessile forms of all four *C. striatum*, PFGE-types and antimicrobial susceptibility profiles (MDR and MDS). Interestingly, planktonic forms of MDS 1961/III strain remained alive until 2% GA treatment (30 min).

Antimicrobial activity can be influenced by many factors such as formulation effects, synergy, temperature, dilution, test method and/or presence of an organic load [34]. Organic matter in the form of serum, blood, pus, or fecal or lubricant material can interfere with the antimicrobial activity of biocides in at least two ways. Most commonly, interference occurs by a chemical reaction between the germicide and the organic matter resulting in a complex that is less germicidal or non-germicidal, leaving less of the active germicide available for attacking microorganisms. Alternatively, organic material can protect microorganisms from attack by acting as a physical barrier; duration of exposure; microorganisms may be protected from disinfectants by production of thick masses of cells and extracellular materials or biofilms. Guideline for Disinfection and sterilization in healthcare facilities describes that the use of GA-based solutions in health-care facilities is widespread because of their advantages, including excellent biocidal properties; activity in the presence of organic matter (20% bovine serum); and noncorrosive action to endoscopic equipment, thermometers, rubber, or plastic equipment [40]. Conversely, our data suggest that presence of the organic matter (BSA 2%) was capable to enhance tolerance to GA treatment (30 min) of *C. striatum* strains, independent of clinical sites,

PFGE-types and multidrug-susceptibility (MDS and MRD) profile. Moreover, survival of sessile forms was significantly higher than planktonic forms during GA treatment (30 min) in the presence of 2% BSA. However, biofilms of MDR clinical isolates of PFGE-type I mostly responsible for a Brazilian nosocomial outbreak and predominantly isolated from patients submitted to endotracheal intubation [22] showed tolerance to 2% GA at higher levels also in the presence organic matter (2% BSA) on both abiotic - glass (hydrophilic) and polystyrene (hydrophobic) – surfaces. The mechanisms that influence *C. striatum* ability to adhere to different hydrophilic and hydrophobic materials with different intensities remain unknown.

For critical medical devices, sterilization and high-level disinfection are mandatory, for this reason we also decided to investigate the effects of PA, a highly effective disinfectant which may be an alternative to GA [54]. However, the use of PA may lead to higher costs, including costs for processing, purchasing and training, installation, and endoscope repairs. Although this product is rapidly effective against a broad range of microorganisms, it tarnishes the metal of endoscopes and is unstable, resulting in only a 24h use life. PA is characterized by rapid action against several microorganisms. Special advantages of PA are that it lacks harmful decomposition products (i.e., acetic acid, water, oxygen, hydrogen peroxide), enhances removal of organic material, and leaves no residue. It remains effective in the presence of organic matter and is sporicidal even at low temperatures. However, PA can corrode copper, brass, bronze, plain steel, and galvanized iron but these effects can be reduced by additives and pH modifications. It is considered unstable, particularly when diluted; for example, a 1% solution loses half its strength through hydrolysis in 6 days, whereas 40% peracetic acid loses 1%–2% of its active ingredients per month. For high-level disinfection procedure PA, may be used at variable concentrations during 12-30 min exposure time at $\geq 20^{\circ}\text{C}$. An alternative high-level disinfectant available in the United Kingdom contains 0.35% PA [55]. In the present study, all MDR and MDS *C. striatum* tested strains of different PFGE-types showed tolerance until 1 min exposure to immediately prepared PA solution at high concentration (2%). Conversely to data previously describe by Rutala (2008) [40], the presence of 2% BSA increased the tolerance of all MDR and MDS *C. striatum* tested at different levels, including MDS 1961/III strain from 1 to 4 min.

Potassium monopersulfate (Virkon) is a multi-purpose disinfectant typically used for cleaning up hazardous spills, disinfecting surfaces and soaking equipment. The solution is used in many areas, including hospitals, laboratories, dental and veterinary facilities, and anywhere else where control of pathogens is required. Previous studies have confirmed bactericidal activity for VK products containing potassium monopersulfate as their primary active

ingredient, including *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [55-56]. However, this product has not demonstrated effectiveness against some bacterial pathogens, such as *Helicobacter pylori* and *L. monocytogenes* and consequently it has not been approved for use in California, USA [56]. Considerable work has taken place with 1% VK and instruments and the key result of this is that if used correctly VK will not damage instruments. Instruments should not be left in VK solution for more than 10 minutes. Over-exposure of a solution, however, to organic material or metal instruments can cause oxidizing activity to be lost in a shorter time than this. VK solution is designed to last for at least 1 to 2 weeks [56]. Until the present moment, data concerning peroxy-compound efficacy and mechanisms involved in inactivation of MDR and MDS *Corynebacterium* species were not found described in literature.

Sodium hypochlorite solutions (SH) is a disinfectant with a broad antimicrobial spectrum and widely used for hard-surface and spillages of human blood [40]. However, it is problematic for reasons such as corrosion of metal and other equipment surfaces, generation of irritating chlorine gas and complicated management of concentrations. On the other hand, disinfectants and cleaning agents formulated with VK that are improvement over chlorine-based disinfectants and cleaning. In addition, it has been reported that with hypochlorous acid as the active substance, there is little metal corrosion and no chlorine odor, and this agent is highly efficacious against many infectious organisms. Furthermore, the United States Environmental Protection Agency (EPA) states that potassium peroxymonosulfate based disinfectants (PPD) are widely effective against such organisms such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) guidelines recommend selection of a disinfectant or cleaning/ disinfectant registered with the EPA for use in environmental maintenance [40]. In addition, the Japanese dialysis guidelines recommend the use of VK in the cleaning and disinfection of environmental surfaces. However, reports regarding the clinical usefulness and sustainability of the effects of PPD are scarce [56].

In the present study, 1% VK and 1% sodium hypochlorite were tested against planktonic forms of *C. striatum*. Overall both biocides were effective because viable bacterial cells were not detected after 1 or 2 min of incubation. However, it's important to point that, VK24h was more effective than VK48h since viable bacterial cells detected after VK48h exposure was at least 2 times higher than what it was observed after VK24h treatment.

Alcohols exhibit rapid broad-spectrum antimicrobial activity against vegetative bacteria, including mycobacteria [40]. Because of the lack of sporicidal activity, alcohols are not recommended for sterilization but are widely used for both hard-surface disinfection and

skin antiseptics. Lower concentrations may also be used as preservatives and to potentiate the activity of other biocides. Many alcohol products include low levels of other biocides (in particular chlorhexidine), which remain on the skin following evaporation of the alcohol, or excipients (including emollients), which decrease the evaporation time of the alcohol and can significantly increase product efficacy. However, efficacy is dependent on the concentrations of both the active agent and the test microorganism. For example, isopropyl alcohol has greater lipophilic properties than ethyl alcohol and is less active against hydrophilic pathogens. Generally, the antimicrobial activity of alcohols is significantly lower at concentrations below 50% and is optimal in the 60 to 90% range. Little is known about the specific mode of action of alcohols, but based on the increased efficacy in the presence of water; it is generally believed that they cause membrane damage and rapid denaturation of proteins, with subsequent interference [40]. Ethyl alcohol at 70% (EtOH) is largely used for skin and instrument disinfection. Presently, planktonic forms of all *C. striatum* strains tested showed tolerance 70% (EtOH) during 1 min exposure. For *C. striatum*, overall observations demonstrated that the strain 1961/III presented the highest resistance to most of biocide tested, while the strain 1954/IV is the most sensitive strain excepted to 2% GA and 70% ET treatments.

Most of critical medical devices are coated with organic matter which may contribute to the reduction of effect of biocides and favor bacterial survival [40]. In addition to results currently demonstrated with GA, the presence of organic matter was able to influence the effect of four other biocides tested on planktonic forms of different *C. striatum* strains. Interestingly, the presence of 2% BSA increased bacterial survival for all biocides tested, specially VK (from 4 to 20 min) and alcohol (from 1 to 30 min).

For the effective prevention of hospital acquired infections it is necessary that clinicians have access to the most current knowledge regarding efficacy and reliability of the most widely used disinfectants. It is also important to have available an extensive knowledge about the behavior possible resistances of emerging infectious agents such as *Corynebacterium striatum* under disinfection conditions. Therefore, the data presented here could be of value to the clinical community. In conclusion, tolerance of sessile and planktonic forms to products used in disinfection and antiseptic procedures, also in the presence of organic matter contribute to the establishment and dissemination of infections (HAIs) caused by MDR and MDS *C. striatum*. Moreover, survival of sessile forms was at least 100% higher than planktonic forms for all tested *C. striatum* strains of different PFGE-types. Biocides may reduce or eliminate bacteria associated to biofilms but the biofilm matrix may remain undisrupted for some pathogens [8, 22, 45, 57]. Therefore, hospital staff should be aware of the circulation of MDR and MDS *C.*

striatum strains presenting tolerance to high-level disinfectants, such as GA and other biocides. This study also indicated that difficulties for bacterial eradication in chronic and device-related infections may occur for MDR corynebacterial species, including *C. striatum*.

ACKNOWLEDGEMENTS

In memoriam: Professor Doctor Raphael Hirata Júnior;

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro*, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Conflict of interests

The authors disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence their work. All authors declare that they have no competing interests.

Reference

- 1- Qin, L, Sakai, Y, Bao, R, Xie, H, Masunaga, K, Miura, M, et al. 2017. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures from hospitalized patients in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 70:152-157.
- 2- Gomila, M, Renom, F, Gallegos Mdell C, Garau, M, Guerreiro, D, Soriano, JB, et al. 2012. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. *BMC Microbiol.* 4:1-8.
- 3- Renom, F, Gomila, M, Garau, M, Gallegos MD, Guerrero, D, Lalucat, J, et al. 2014. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New Microbes New Infect.* 2:106-114.
- 4- Campanile, F, Carretto, E, Barbarini, D, Grigis, A, Falcone, M, Goglio, A et al. 2009. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg Infect Dis.* 15:75-78.
- 5- Baio, PVP, Mota, HF, Freitas, AD, Gomes, DL, Ramos, JN, Sant'anna, LO, et al. 2013. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz;* 108:23-29.
- 6- Verroken, A, Bauraingm C, Deplano, A, Bogaerts, P, Huang, D, Wauters, G, et al. 2014. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 20:44-50.

- 7- Wang, J, Du, X, Cui, J, Guo, S, Fu, Q, Wang, Y, et al. 2014. Drug susceptibility and homologous analysis on *Corynebacterium striatum* strains isolated from inpatients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 94:2501-2505.
- 8- Alibi, S, Ferjani, A, Boukadida, J, Cano, ME, Fernández-Martínez, M, Martínez-Martínez, L, et al. 2017. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*. 7:1.
- 9- Kalt F, Schulthess B, Sidler F, Herren S, Fucentese SF, Zingg PO, Berli M, Zinkernagel, AS, Zbinden R, Achermann Y. 2018. *Corynebacterium* species rarely cause orthopedic infections. *J Clin Microbiol* 56:01200-18.
- 10- Renom, F, Gomila, M, Garau, M, Gallegos MD, Guerrero, D, Lalucat, J, et al. 2014. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New Microbes New Infect*. 2:106-114.
- 11- Daisuke, U, Oishi, T, Yamane, K, Terada, K. 2017. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with a catheter-related blood stream infection. *Case Rep Infect Dis*.
- 12- Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, et al. 2012. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*. 50:1518-23.
- 13- Yoo, G, Kim, J, Uh, Y, Lee, HG, Hwang, GY, Yoon, KJ. 2015. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* bacteremia: first case in Korea. *Ann LabMed*.;35:472-473.
- 14- Hascoet, S, Mauri, L, Claude, C, Fournier, E, Lourtet, J, Riou, JY, et al. 2017. Infective endocarditis risk after percutaneous pulmonary valve implantation with the melody and sapien valves. *JACC Cardiovasc Interv*.;10:510-517.
- 15 - Verma, R, Kravitz, G. 2016. *Corynebacterium striatum* empyema and osteomyelitis in a patient with advanced rheumatoid arthritis. *BMJ Case Reports*. doi:10.1136/bcr-2016-214691.
- 16 - Beteta Lopez A, Gil Ruiz MT, Vega Prado L, et al. 2009. Cystitis and hematuria due to *Corynebacterium striatum*. A case report and review. *Actas Urol Esp*.33:909-12.
- 17- Werth, B.J., Hahn, W.O., Butler-Wu, S.M., Rakita, R.M. 2016. Emergence of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum* in two patients with left ventricular assist device infections. *Microb Drug Resist*. 22:233–7.
- 18 – Oliva, A., Belvisi, V., Iannetta, M, Andreoni C, Mascellino MT, Lichtner M, Vullo V, Mastroianni CM. 2010. Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. *J Clin Microbiol*. 48:4669-4671.
- 19 - Fernández Guerrero, M.L., Molins, A., Rey, M., Romero, J., Gadea, I. 2012. Multidrug-resistant *Corynebacterium* successfully treated with daptomycin. *Int J Antimicrob Agents*. 40:373–4.

- 20- Ishiwada, N., Watanabe M., Murata, S., Takeuchi, N. 2016. Clinical and bacteriological analyses of bacteremia due to *Corynebacterium striatum*. *J Infect Chemother.* 12:790-793.
- 21 - Massuda, H., Masai, T., Takatani, M., Kato, H. 2018. A life-threatening infection due to *Corynebacterium striatum*: a lesson learned. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 4:709-710.
- 22 - Souza, C., Faria Y.V., Sant'Anna L.O., *et al.* 2015. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*110:242-248.
- 23- Quinn, B., Baker, D. 2015. Using oral care to prevent nonventilator hospital-acquired pneumonia. *Am Nurse Today.* 10:18-23.
- 24- Chandran, FL, Puthukkichal, DR, Suman, E, Mangalore, SK. 2016. Diphtheroids-important nosocomial pathogens. *J Clin Diagn Res.*10:DC28-DC31.
- 25 - Severo, CB, Guazzelli, LS, Barra, MB, Hochhegger, B, Severo, LC. 2014. Multiple pulmonary nodules caused by *Corynebacterium striatum* in an immunocompetent patient. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 56:89-91.
- 26- Yoo, G, Kim, J, Uh, Y, Lee, HG, Hwang, GY, Yoon, KJ. 2015. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* bacteremia: first case in Korea. *Ann LabMed.* 35:472-473.
- 27- Daisuke, U, Oishi, T, Yamane, K, Terada, K. 2017. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with a catheter-related blood stream infection. *Case Rep Infect Dis.* doi:10.11552682149.
- 28- Pitombo M.B. Lupi O., Duarte R.S. 2009. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? *Rev Bras Ginecol Obstet.* 31(11):529-33.
- 29- Lorena, N.O.S., Duarte, R.S., Pitombo, M.B. 2009. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos vídeo cirúrgicos - a hipótese do glutaraldeído. *Rev Col Bras Cir.* 36(3):266-267.
- 30- Otter, H. 2015. Health: Challenging a pet hypothesis, *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.* 291-294.
- 31- Parfentjev I. A. and Catelli, A. R. 1964. Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *Journal of bacteriology.* 88(1):1-3.
- 32- Russell, A.D. 1994. Glutaraldehyde: current status and uses. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 15:724-733.
- 33- Russell, A.,D, Russell N.J. 1995. Biocides: activity, action and resistance. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 53:327-365.
- 34- McDonnell, G., Russell, D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol.* 12:147-179.

- 35- Carvalho RV, Limad, FFS, Santos, CS, Souza, MC, Silva, RS, Mattos-Guaraldi, AL. 2018. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients, *braz j infect dis*;22(4):347–351.
- 36- Camello, T.C.F., Mattos-Guaraldi, A.L., Formiga, L.C.D. And Marques, E.A. 2003 Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol*34, 39-44.
- 37- Martins, C. A. S.; Faria, L. M.D.; Souza, M. C.; Camello, T. C. F.; Velasco, E.; Hirata, R. Jr.; Thuler, L. C. S.; Mattos-Guaraldi A. L. 2009. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; 104: 905-913.
- 38 - Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection.* 18(3) 268-28.
- 39 - *American Society for Testing and Materials* – International. 2008. 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, ASTM E 2315 – 03.
- 40 - Rutala, W.A., Weber, D.J. 2008. Centers for Disease control and Prevention – CDC. Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities. pp158.
- 41 - Smith, K. end Hunter, I.S. 2008. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol.* 8:966-73.
- 42 - Morente, E.O., Fernández-Fuentes, M. A., Burgos., Grande., Pulido Hikmate, M. J., et al.2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 162:13–25.
- 43 - Moraes, M., Andrade, N., Chaves, J., Passos, F., Gomide, L. 1997. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. *Food Science and Technology.* 17(3):325-329.
- 44 - Gnanadhas, S.A.M. & Dipshikha, C. 2013. Biocides -resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 22(2):191-206.
- 45 - Grobe, K.J., Stewart, P.S. 2000. Characterization of GA efficacy against bacterial biofilm. *Corrosion.*124:1-11.
- 46 - Souza, A.C.S., Pereira, M.S., Rodrigues, M.A.V. 1998. Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. *Rev Latino-Am Enf.* 6:95-105.
- 47- Ratti, R.P., Gomes, B.C., Martinez, R.C.R., Souza, V.M., Martinis, E.C.P. 2010. Elongated cells of *Listeria monocytogenes* in biofilms in the presence of sucrose and bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* All. *Food Science and Technology.* 30:1011-1016.

48 - Wong, K., Chan, Y., Wong, C. 2010. *Corynebacterium striatum* as an emerging pathogen. J Hosp Infect. 76: 371–372.

49- John, N., Mbithi, S.V., Syed, A. S., Pacquette M. 1993. Bactericidal, Virucidal, and Mycobactericidal Activities of Reused Alkaline Glutaraldehyde in an Endoscopy Unit, Journal of Clinical Microbiology. 31(11):2988-95.

50 - Vikram, A., Bomberger, J., Kyle, J. B. 2015. Eflux a gluteraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas Fluorescens* end *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 59(6):3433-40.

51 - Svetlíková, Z., Skovierová, H., Niederweis, M., Gaillard, J.L., McDonnell, G., Jackson, M. 2009. Role of porins in the susceptibility of Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium chelonae to aldehyde-based disinfectants and drugs. Antimicrob Agents Chemother. 53(9):4015-8.

52 - Rey, J., Bjorkman, D., Nelson, D., et al. 2011. Endoscope disinfection a resource-sensitive approach. World Gastroenterology organization. http://www.worldendo.org/wp-content/uploads/2016/03/wgo_weo_endoscope_disinfection.pdf

53 - Mello, D.R., et. Al. 2007. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços. Nota 04/2007 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. http://anvisa.gov.br/servicosaude/control/Alertas/informe_tecnico_04.pdf

54 - Dunowska, M., Morley, P.S., Hyatt, D.R. 2005. The effect of Virkon R S fogging on survival of *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* on surfaces in a veterinary - teaching hospital. Vet Microbiol.105: 281–289.

55 - Martin, H., Soumet, C., Fresnel, R., Morin, T., et al. 2013. Comparison of the virucidal efficiency of peracetic acid, potassium monopersulfate and sodium hypochlorite on hepatitis A and enteric cytopathogenic bovine orphan virus. The Society for Applied Microbiology.115:955-968.

56 - Matsuoka, T., Yoshida, S., Ohashi, K., Shinoda, Y., Kato, M., Teramachi H. 2017. Evaluation of efficacy and clinical utility of potassium peroxydisulfate-based disinfectants. Canadian Journal of Infection Control. 32(2):93-97.

57 - Emmanuel, E., Hanna, K., Bazin, C., Keck, G., Clément, B., Perrodin, Y. 2005. Fate of GA in hospital wastewater and combined effects of GA and surfactants on aquatic organisms. Environ Int. 31(3):399-406.

Figures legends

Figure 1. Bactericidal effects of 2% glutaraldehyde (2% GA) and 2% peracetic acid (2% PA) on planktonic forms of *C. striatum* strains in the presence or not of organic matter (2%BSA); Bactericidal effects of Virkon® (VK) on planktonic forms of *C. striatum* strains in the presence or not of organic matter (2%BSA) and Bactericidal effects of 1% sodium hipocloride (1%

NaClO) and 70% EtOH on planktonic forms of *C. striatum* strains in the presence or not of organic matter (2% BSA).

Figure 2. Scanning electron micrographs illustrating mature biofilm on polyurethane catheter surfaces (48 h) treated (**A,C,E, G**) and untreated (**B,D,F,H**) with 2% glutaraldehyde solution (30 min) by multidrug-resistant (MDR) and multidrug-susceptible (MDS) *Corynebacterium striatum* strains of different pulsed-field gel electrophoresis: **A,B**: MDR 1987/I (bronchoalveolar lavage); **C,D**: MDR 2369/II (tracheal secretion); **E,F**: MDS 1961/III (urine); **G,H**: MDS 1954/IV (wound lesion); **A,C**: amorphous material on catheter surface was kept evident post-treatment with biocide; elongated cells of *C. striatum* were observed and may indicate an adaptation mechanism to stress conditions.

Table 1. Epidemiological, clinical and microbiological features of *Corynebacterium striatum* strains previously isolated from patients of an University hospital at the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil*

Strains / year	Clinical nosocomial characteristics					Antimicrobial susceptibility profiles	PFG E-types	Bacterial spontaneous autoaggregating properties (SA)	Biofilm formation on abiotic surfaces
	Isolation site	Gender/Age (years-old)	Hospital Location	Outcome	Culture				Polyurethane catheter (CFU mL ⁻¹)
1987 BR-RJ / 09	BAL	F/50	Nursery 18	Death	Pure (2.0 x 10 ⁵ CFU)	MDR	I	SA-positive	>5 x 10 ⁷ #
2369 BR-RJ / 09	TA	M/NI	General ICU	Cure	Pure	MDR	II	SA-positive	<5 x 10 ⁷
1961 BR-RJ / 09	Urine	F/37	Infectious Diseases Ward	NI	Pure (2.5 x 10 ⁵ CFU)	MDS	III	SA-positive	>5 x 10 ⁷
1954 BR-RJ / 09	Surgical wound	M/NI	Thoracic Surgical Ward	NI	Pure	MDS	IV	SA-positive	<5 x 10 ⁷

BAL, Broncho alveolar lavage; TA, Tracheal aspirate; MDR, multidrug resistance presenting resistance to more than three classes of different antibiotics (Magiorakos et al., 2012); MDS, multidrug-susceptible; PFGGE, pulsed-field gel electrophoresis; NI = Not informed; F = female; M = male; CFU, colony-forming units. *, Baio et al., 2013 and Souza et al., 2015; #, highest ability of biofilm formation (p < 0.05).

Table 2.

Biocides/ concentration	Recommended contact time ^c (min)	Neutralizer	Antimicrobial action	Spectrum action	References
2% Glutaraldehyde	3-30	% Sodium sulphite Souza <i>et al.</i> , 1998	Desinfection Preservation Esterelization	High-level ^a	Rutala <i>et al.</i> , 2008 ANVISA 04/2007 Mello <i>et al.</i> , 2007
2% Peracetic acid	15	6% sodium thiosulfate Souza <i>et al.</i> , 1998	Desinfection Esterelization	High-level ^a	Morais <i>et al.</i> , 1997 Sekusept®
1% Sodium hypochlorite	5-20	0.6 % sodium thiosulfate Souza <i>et al.</i> , 1998	Desinfection Cleaning	Intermediate- level ^b	Mcdonnell e Russell 1999; ANVISA 2016
1% Potassium monopersulfate (VIRKON®)	20	1.0% sodium thiosulfate + 10% fetal bovin serum Álvarez <i>et al.</i> , 2011	Desinfection	High - level ^a	Dunowska <i>et al.</i> 2005; Matsuoka <i>et al.</i> 2017; Martim <i>et al.</i> , 2013
70% Ethyl alcohol	≥ 1	2% Tween 80 Souza <i>et al.</i> , 1998	Antiseptics Desinfection Preservation	Low-level ^c	Mcdonnell e Russell 1999; Wijesinghe e Weerasinghe 2010

^a High-level biocide are recommended for sterilization and high- level disinfection; ^b recommended for disinfection of semi-critical material; ^c low-level biocide is recommended for intact skin or surfaces. Contact time based on manufacturer recommendations; VIRKON®, a multi-purpose disinfectant containing oxone (potassium monopersulfate); Sekusept®, CS – Portugal – 2009-01-26 - Aktiv (<http://www.endowork.pt/produtos/Sekusept%20Aktiv.pdf>).

Table 3. Overall biocide effect on planktonic forms of *C. striatum* and the influence of organic matter (2% BSA).

Biocide	<i>C. striatum</i> strain / pulsotype			
	1987/I	2369/II	1961/III	1954/IV
	Biocide alone or with 2%BSA CFU/mL* (max. survival time)			
2% GA	1.5 x 10 ³ (20 min)	1.0 x 10 ³ (2 min)	1.5 x 10 ³ (30 min)	1.0 x 10 ³ (4 min)
2% GA + 2%BSA	2.0 x 10 ³ (20 min)	1.5 x 10 ³ (20 min)	4.0 x 10 ³ (30 min)	0.2 x 10 ³ (10 min)
2% PA	6.5 x 10 ³ (0.25 min)	0.5 x 10 ³ (0.5 min)	0.5 x 10 ³ (1 min)	1.5 x 10 ³ (0.25 min)
2% PA + 2% BSA	2.0 x 10 ³ (0.5 min)	1.0 x 10 ³ (0.5 min)	2.0 x 10 ³ (4 min)	2.5 x 10 ³ (0.25 min)
1% SH	3.5 x 10 ³ (0.25 min)	2.5 x 10 ³ (0.25 min)	2.0 x 10 ³ (1 min)	2.0 x 10 ³ (0.25 min)
1% SH +2% BSA	1.0 x 10 ³ (0.5 min)	1.0 x 10 ³ (0.5 min)	1.5 x 10 ³ (2 min)	2.5 x 10 ³ (0.5 min)
VK 24h	2.5 x 10 ³ (0.5 min)	3.5 x 10 ³ (0.25 min)	7.0 x 10 ³ (2 min)	3.0 x 10 ³ (0.25 min)
VK 24h +2% BSA	2.0 x 10 ³ (0.5 min)	1.5 x 10 ³ (20 min)	1.5 x 10 ³ (20 min)	1.5 x 10 ³ (20 min)
VK 48h	0.9 x 10 ³ (2 min)	0.6 x 10 ³ (4 min)	1.5 x 10 ³ (4 min)	0.4 x 10 ³ (0.25 min)
VK 48h + 2% BSA	0.2 x 10 ³ (4 min)	0.6 x 10 ³ (10 min)	0.1 x 10 ³ (20 min)	0.3 x 10 ³ (1 min)
70% EtOH	1.0 x 10 ³ (0.5 min)	1.5 x 10 ³ (0.5 min)	2.5 x 10 ³ (1 min)	2.0 x 10 ³ (0.5 min)
70% EtOH + 2% BSA	2.0 x 10 ³ (0.5 min)	1.5 x 10 ³ (4 min)	5.5 x 10 ³ (30 min)	15 x 10 ³ (2 min)

*Data from tables 1-3

Table 4. *C. striatum* CFU counting recovered from biofilm formed in different surfaces after 2% GA exposure and the influence of organic matter (2% BSA).

Substrate	Strain / Pulsotype	Untreated	2%GA	2%GA+BSA
		CFU/mL (% survival) *		
Glass	1987/I	2.9 x 10 ⁷ (100%)	8.6 x 10 ³ (0.03%)	27 x 10 ³ (0.09%)
	2369/II	9.7 x 10 ⁷ (100%)	8.0 x 10 ³ (0.01%)	12 x 10 ³ (0.01%)
	1961/III	1.1 x 10 ⁷ (100%)	8.3 x 10 ³ (0.07%)	33 x 10 ³ (0.29%)
	1954/IV	1.1 x 10 ⁷ (100%)	2.3 x 10 ³ (0.02%)	5.7 x 10 ³ (0.05%)
Metal	1987/I	6.7 x 10 ⁷ (100%)	25 x 10 ³ (0.04%)	29 x 10 ³ (0.05%)
	2369/II	0.3 x 10 ⁵ (100%)	18 x 10 ³ (6.0%)	21 x 10 ³ (7.2%)
	1961/III	1.3 x 10 ⁷ (100%)	75 x 10 ³ (0.06%)	80 x 10 ³ (0.06%)
	1954/IV	1.4 x 10 ⁷ (100%)	7.0 x 10 ³ (0.05%)	10 x 10 ³ (0.08%)
Thermanox	1987/I	30 x 10 ⁷ (100%)	80 x 10 ³ (0.03%)	96 x 10 ³ (0.03%)
	2369/II	1.2 x 10 ⁷ (100%)	20 x 10 ³ (1.18%)	26 x 10 ³ (0.22%)
	1961/III	1.2 x 10 ⁷ (100%)	65 x 10 ³ (0.54%)	70 x 10 ³ (0.58%)
	1954/IV	1.3 x 10 ⁷ (100%)	11 x 10 ³ (0.09%)	13 x 10 ³ (0.10%)
Polyurethane	1987/I	3.3 x 10 ⁷ (100%)	13 x 10 ³ (0.04%)	37 x 10 ³ (0.11%)
	2369/II	1.2 x 10 ⁷ (100%)	4.0 x 10 ³ (0.04%)	9.7 x 10 ³ (0.08%)
	1961/III	1.2 x 10 ⁷ (100%)	47 x 10 ³ (0.40%)	67 x 10 ³ (0.60%)
	1954/IV	1.4 x 10 ⁷ (100%)	13 x 10 ³ (0.01%)	17 x 10 ³ (0.01%)

** % survival compared to untreated

Figure 1

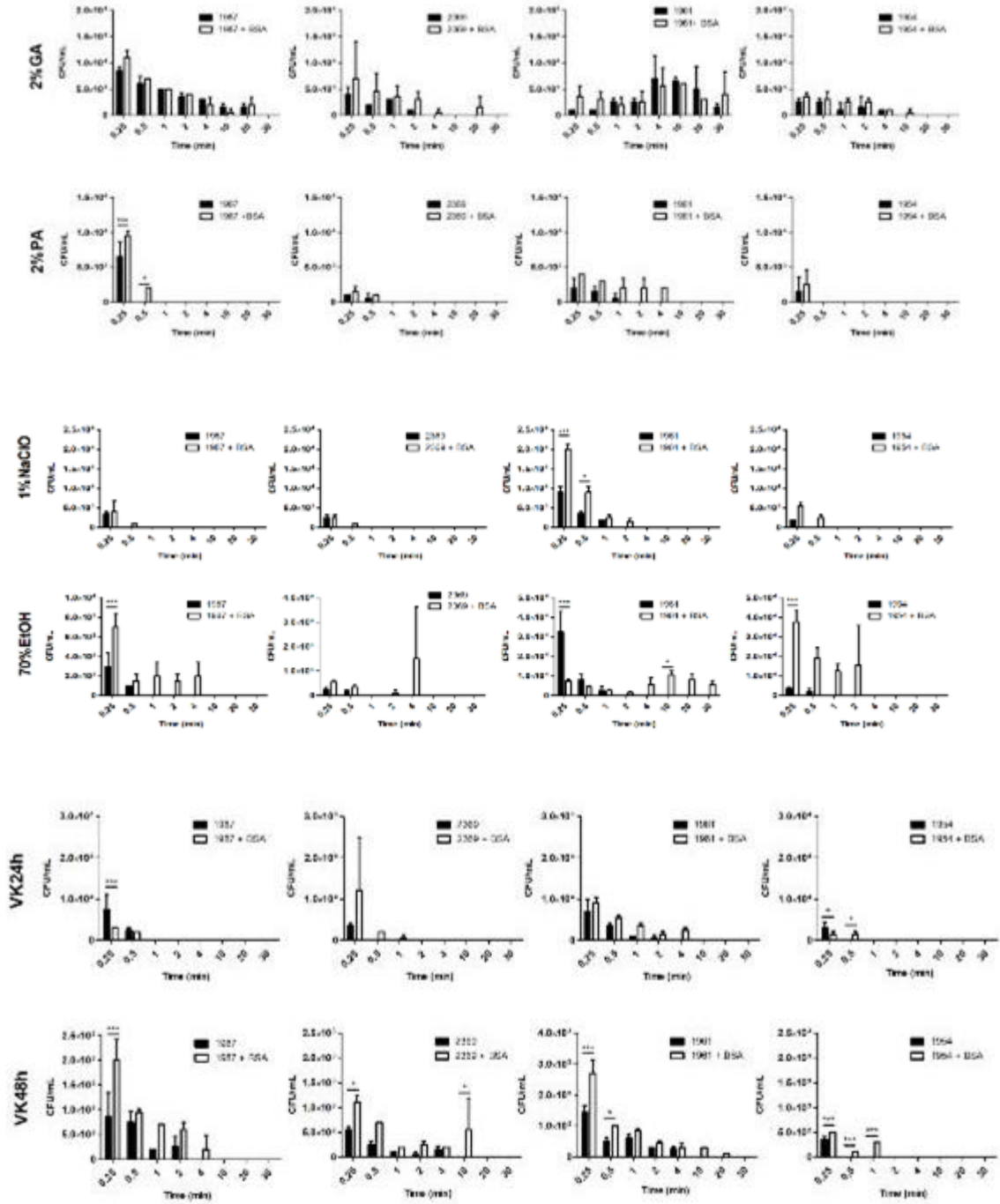
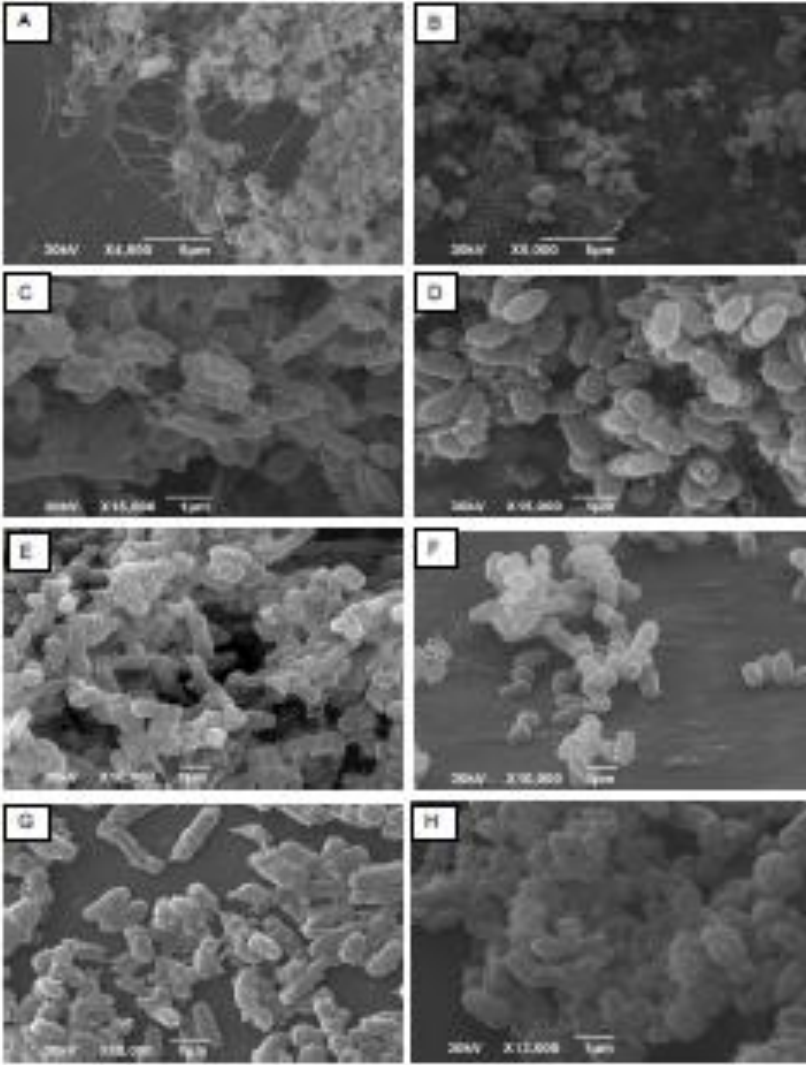


Figure 02



5 DISCUSSÃO

Atualmente, a maioria dos casos associados a doenças infecciosas em pacientes imunocomprometidos foi relacionada com espécies bacterianas normalmente encontradas no meio ambiente ou na microbiota anfibiônica humana (QUIN et al., 2017). Patógenos emergentes, incluindo *C. striatum*, que na sua maioria podem apresentar resistência e/ou tolerância a diversos agentes químicos antimicrobianos, permanecem sendo subestimados e considerados meros contaminantes por diferentes setores médico laboratorial (CAMPANILE et al., 2000; KALTH et al., 2017; OTSUKA et al., 2011). A gravidade desses fatos se intensifica pelo desconhecimento do potencial de patogenicidade de algumas espécies, dificuldade em programas de imunização e problemas relacionados com inexistência de vacina para alguns patógenos altamente virulentos (CAMPANILE et al., 2000).

Um número crescente de relatos de infecções por clones de *C. striatum* multirresistentes têm sido documentado em pacientes hospitalizados (BAIO et al., 2013; CAMPANILE et al., 2009; OTSUKA et al., 2006; QIN et al., 2017; VERROKEN et al., 2014; WANG et al. 2014). Entretanto, em países em desenvolvimento, as notificações de infecções por *C. striatum* permanecem raras (CAMELLO et al., 2003; SUPERTI et al., 2009). Este fato pode estar relacionado à ausência de estudos, e conseqüentemente ao desconhecimento da patogenicidade de *C. striatum* e outros agentes etiológicos subestimados, além da grande dificuldade de identificação de espécies de corinebactérias, incluindo *C. striatum*, tanto pela questão sócioeconômica na aquisição de equipamentos automatizados, como MALDI-TOF que são onerosos aos cofres públicos e privados, quanto pela ausência de metodologias fenotípicas e capacitação de profissionais, uma vez que espécies de corinebactérias possuem características bioquímicas e morfológicas muito similares (QIN et al., 2017).

C. striatum, geralmente, encontra-se colonizando superfícies cutaneomucosas humanas. Na maioria dos casos, o isolamento deste patógeno tem sido observado em amostras clínicas de pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva e submetidos a procedimentos médicos invasivos. Infecções causadas por *C. striatum* vem aumentando tanto em países industrializados quanto nos países em desenvolvimento (CAMPANILE et al., 2009; QUIN et al., 2018). Portanto, as equipes clínicas e laboratoriais devem permanecer atentas para o correto isolamento e diagnóstico, bem como, a utilização de medidas adequadas para o controle de *C. striatum*, que em diversas oportunidades foi capaz de causar surtos nosocomiais e morte de pacientes.

Em razão da grande variedade de espécies do gênero *Corynebacterium*, alguns microbiologistas alertam para as similaridades bioquímicas entre as espécies de corinebactérias. O seu correto diagnóstico e identificação exige conhecimento e experiência profissional. *Corynebacterium xerosis*, *C. striatum*, *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium amycolatum*, por apresentarem comportamento fenotípico similar, foram agrupadas no chamado complexo *Corynebacterium* XSMA. Tal problemática prejudica a especificidade de alguns sistemas de galerias de identificação (CAMELO et al., 2003; LETEK et al., 2006).

Amostras de *C. striatum*, têm sido relacionadas como agente etiológico de diferentes quadros clínicos infecciosos, tais como: bacteremia, pneumonia, endocardite, além de sepsis relacionada ao uso de cateter e infecções de feridas, sendo vinculadas também ao uso de dispositivos médicos invasivos encontrados em setores clínicos tais como: cateter, tubos e mangueiras endotraqueais, endoscópios, entre outros. Equipamentos não invasivos e outras superfícies inertes encontrados nos diferentes setores hospitalares também podem estar contaminados com *C. striatum*. Tal problemática pode ser agravada, em razão da possibilidade das infecções atribuídas a *C. striatum* poderem ser transmitidas entre os pacientes e profissionais de saúde (BRANDENBURG et al., 1996; CAMPANILE et al., 2009 LEONARD et al., 1994; MARTINEZ - MARTINEZ et al., 1995;).

Em estudos adicionais realizamos o monitoramento de *C. striatum* isolados entre 2009 e 2018 (n=112) também foram comparados os resultados de identificação obtidos pelos métodos bioquímicos convencionais com as técnicas moleculares MALDI-TOF e sequenciamento de genes conservados 16S RNA e *rpoB*. Os Resultados demonstraram eficácia na identificação de *C. striatum* pela técnica MALDI-TOF (espectrometria de massa de proteínas ribossomais), assim como previamente observado por outros autores (GOMILA et al., 2012; PELOSO et al., 2013).

Todas as amostras enviadas para análise de MALDI-TOF (n=48) foram confirmadas como *C. striatum* com scores acima de 2.0, considerado identificação segura (PELOSO et al., 2013). Adicionalmente (n=16) amostras de *C. striatum* confirmadas por MALDI – TOF foram também confirmadas pelo sequenciamento de genes conservados *16S rpoB*.

Devido ao crescente número de casos de infecções nosocomiais causados por patógenos MDR, pertencentes ao complexo XSMA, principalmente por *C. striatum*, à dificuldade de identificação em razão da similaridade bioquímica, à ineficácia de sistemas semiautomatizados como API – CORYNE – BioMerieux (Brasil), ao custos elevados na aquisição de equipamentos de identificação automatizados de última geração como: MALDI – TOF e PCR, desta forma nossa equipe vem utilizando um esquema de triagem para a detecção da espécie do complexo

XSMA, especialmente *C. striatum*, a partir de bastonetes Gram positivos isolados de espécimes clínicas.

O uso deste esquema de triagem no LDCIC (laboratório especializado em corineobactérias há mais de 40 anos) mostrou-se bastante eficaz e econômico para a identificação destas espécies, incluindo *C. striatum*, recebidas de diversas unidades hospitalares. Os resultados obtidos indicaram que o método de triagem pode ser utilizado em instituições de assistência à saúde, particularmente em países em desenvolvimento, pois dispensa grandes recursos financeiros e logísticos.

Assim como observado por Ramos e Mota (2014), os testes fenotípicos convencionais e sistema semiautomatizado API *Coryne* foram ineficazes para identificar os microrganismos do complexo, em especial *C. striatum*. Desta forma o método de triagem proposto pelo LDCIC demonstrou eficiência na identificação de outras espécies resultando em um diagnóstico preciso, acelerando o processo de identificação e consequentemente auxiliando na escolha da terapia antimicrobiana apropriada, uma vez que, houve um crescimento de relatos sobre infecções nosocomiais incluindo surtos causados por *C. striatum*.

Os ensaios de PFGE são ferramentas valiosas para investigar a relação de parentesco clonal das amostras microbianas isoladas durante surtos nosocomiais. Vários estudos empregaram essa metodologia, detectando clones de *C. striatum* (ALIBI et al., 2017; QIN et al., 2017; VERROKEN et al., 2014; WANG et al., 2016). PFGE é um método de genotipagem estável, no entanto, não existem comparações para genotipagem de isolados de *C. striatum* apenas padronizações para laboratórios, tornando o método apenas aplicável para comparar isolados de *C. striatum* para vigilância epidemiológica regional (RAMOS, 2014). Gomila e colaboradores (2012) descreveram o desenvolvimento de um esquema de tipagem de sequência (MLST) para *C. striatum*. No entanto, o esquema MLST proposto não foi adotado pela comunidade científica, talvez devido ao número limitado de genes (região ITS1, *gyrA* e *rpoB*), que o compõem. PFGE apresenta limitações, mas é a ferramenta disponível até o momento para a discriminação dessas espécies bacterianas. Pesquisas futuras são necessárias para avaliar métodos de genotipagem que fornecem dados úteis para vigilância de infecções causadas por *C. striatum*.

No surto do HUPE, Baio e colaboradores, em 2013, descreveram as características iniciais das amostras de *C. striatum* isoladas do HUPE – UERJ. Amostras representativas de diferentes sítios anatômicos foram isoladas de sete setores hospitalares. As amostras pertencentes aos clones I e II apresentaram maior prevalência, sendo isoladas de secreção traqueal e de sangue e apresentaram perfil MDR. Apenas duas amostras, pertencentes aos

clones III e IV, isoladas de urina e secreção de feridas, respectivamente, se apresentaram suscetíveis (MDS) a maioria dos antimicrobianos testados.

Estudos de genotipagem realizados com amostras isoladas do Hospital do Exército, localizado na cidade do Rio de Janeiro, apresentaram características semelhantes às amostras do HUPE-UERJ, como perfil de resistência (MDR), fonte de isolamento (isoladas de sítios respiratórios) e parentesco clonal com as amostras de *C. striatum* pertencentes ao PFGE I, sendo então caracterizadas no perfil PFGE Ic, seguindo uma sequência de identificação clonal que até o momento já conta com 10 clones distintos, além de semelhantes clonais (Ia e Ib) (**Artigo 2**) (SILVA, 2017).

Ao todo, 112 amostras de *C. striatum* foram confirmadas em diferentes sítios anatômicos, em 21 setores da unidade hospitalar HUPE/UERJ, durante o período de 2009 a dezembro de 2018. Foi possível observar a existência de uma persistência endêmica de *C. striatum* no HUPE, configurando a permanência do patógeno no ambiente hospitalar.

Amostras de *C. striatum* foram encontradas crescentemente de 2009 (n=14) a 2012 (n=30), entretanto, nos anos seguintes, em 2013 (n=11) e 2014 (n=09), observou-se uma acentuada diminuição do isolamento de *C. striatum*. Tal queda pode estar associada com a concomitante diminuição do número de atendimentos realizados no HUPE, relacionada à grave crise econômica que se instaurou sobre o Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ. No entanto, outros possíveis fatores podem estar relacionados, como: o crescente número de estudos sobre a espécie, mudança dos processos de desinfecção e principalmente a troca do agente biocida.

Análise dos aspectos epidemiológicos de *C. striatum* permitiu a observação no período temporal deste estudo que 95/112 das amostras isoladas deste estudo foram oriundas de pacientes internados no HUPE sendo a maioria relacionada a sítios do trato respiratório (58/112), como aspirado traqueal, secreção de nasofaringe e lavado bronco alveolar proveniente de pacientes submetidos a procedimentos de auxílio respiratório como ventilação mecânica, encontradas de diferentes setores críticos do hospital, como UTI geral e de transplante. As amostras dos sítios sangue (14/112) e cateteres (12/112) apresentaram a segunda maior prevalência (n=28). Os achados epidemiológicos foram similares com os estudos publicados por Campanile e colaboradores (2009) na Itália e Wong e colaboradores (2010) na China. Os resultados demonstram grande fator de risco para a aquisição de infecção por *C. striatum*, principalmente, para pacientes admitidos em setores clínicos vinculados a procedimentos médicos invasivos, como cateterização e processos endotraqueais, assim como também observaram Nhanet et al. (2012) e Serban et al. (2012).

É necessário ressaltar que, assim como em outros estudos, o isolamento da maioria das amostras *C. striatum* está associada com o uso de dispositivos médicos hospitalares, não apenas em tubos ou cateteres, mas também em outros materiais presentes em ambientes hospitalares (CAMPANILE et al., 2009).

Embora, a maioria das amostras tenha sido isolada de sítios relacionados com trato respiratório, mais precisamente em secreção traqueal, Yoo e colaboradores (2015) descreveram um número expressivo de amostras de *C. striatum* de infecções hematogênicas.

Em atenção a estudos que demonstraram que amostras de *C. striatum* também foram responsáveis por casos de pneumonia associada à ventilação mecânica, sepse relacionadas ao uso de cateter, traqueobronquite associada à ventilação mecânica e infecções de feridas (DAISUKE et al., 2017) foi estudado o potencial patogênico de amostras de *C. striatum* isoladas de sangue e cateter isoladas do HUPE-UERJ (**Artigo 2**).

As amostras isoladas de sangue e cateter apresentaram ser multirresistente (MDR), exceto a amostra 2376 PFGE X que apresentou sensibilidade à maioria dos agentes testados. O fenótipo MDR foi caracterizado seguindo critérios adotados por Magiorakos (2012), o qual considera ser MDR as amostras que resistirem a três ou mais classes distintas de antimicrobianos no teste de disco-difusão.

O método de suscetibilidade por disco-difusão é amplamente utilizado pelos laboratórios de microbiologia no Brasil e em outros países (BAIO et al., 2013; IWALOKUN, et al., 2011; SUPERTI, et al., 2009). No entanto, permanece raramente realizado em *Corynebacterium* spp. (MARTINS et al., 2009) devido ao fato das diretrizes do CLSI não fornecerem pontos de corte para a difusão de disco, enquanto o BrCAST, baseado no documento EUCAST, fornece pontos de corte para as corinebactérias, apenas para alguns antibióticos, como cefalosporinas, carbapenêmicos e lipopeptídeos, o que leva os pesquisadores a usarem frequentemente os pontos de corte para estafilococos (ALIBI S et al., 2017; BAIO et al., 2013, BELTRÁN-ARROYAVE et al., 2016).

Embora o teste de suscetibilidade deva ser realizado em isolados de corinebactérias clinicamente significativas, a seleção inicial de antibióticos deve ser influenciada pela gravidade da infecção. A experiência atual favorece a vancomicina em infecções significativas (DAS et al., 2016; VERROKEN et al., 2014).

Neste cenário preocupante, alguns estudos mencionam terapia com associação de dois agentes antimicrobianos, como: vancomicina e rifampicina e linezolida e daptomicina (CRABTREE et al., 2003; OLENDER, 2013).

Nossos resultados demonstram que maioria dos isolados de *C. striatum* expressam perfis MDR PFGE (I, II, V, VI, VII, VIII, IX), suscetíveis apenas à vancomicina, linezolida, daptomicina e tetraciclina e resistentes a outros nove agentes antimicrobianos, incluindo a rifampicina. Apenas os perfis PFGE (III, IV e X) se apresentaram susceptíveis a maioria dos antibióticos testados (MDS).

As correlações entre a fonte de isolamento, incidência com os setores, os procedimentos hospitalares inadequados, procedimentos invasivos como veículo de infecções facilitadas e resistência antimicrobiana se apresentam negativamente na recuperação da saúde do paciente se tornado um grande problema para saúde pública (ASLAM et al., 2018).

Atualmente, estudos sobre o surgimento e disseminação de espécies bacterianas multirresistentes são importantes para apoiar o progresso das políticas de controle de resistência.

Otsuka e colaboradores (2006) relataram que amostras de *C. striatum* de origem respiratória foram obtidas de pacientes que tiveram internações longas e que receberam vários tratamentos com antibióticos. Diversos pulso tipos têm sido associados a surtos hospitalares de origem respiratória e aos fenótipos MDR. Na Itália, amostras MDR de *C. striatum* foram isoladas de pacientes hospitalizados submetidos à cirurgia ou admitidos em unidades de terapia intensiva. Oitenta e sete por cento (87%) das amostras de *C. striatum* isolados do HUPE apresentaram perfil de resistência MDR, diferentemente dos achados em 2006 por Otsuka no Japão, e na Itália relatado por Campanile e colaboradores (2009), onde 100% das amostras investigadas apresentaram perfil MDR. Interessantemente, nos três estudos distintos (Brasil, Japão e Itália) a vancomicina foi o antibiótico mais efetivo no tratamento contra *C. striatum*. No entanto, amostras resistentes à vancomicina e linezolida também foram relatadas por Campanile e colaboradores (2009).

A terapia combinada, que também inclui o imipenem e outros antimicrobianos, tem sido utilizada para o tratamento de infecções por *C. striatum* MDR no Brasil. No entanto, deve ser mais prudente a sua utilização, uma vez que a maioria das amostras isoladas do HUPE apresentaram resistência ao imipenem.

O tratamento efetivo de infecções por corinebactérias com daptomicina também foi relatada na literatura. Nossos resultados demonstraram que todos os isolados de *C. striatum* isolados no HUPE mostraram susceptibilidade à daptomicina. Em contraste, estudo recente documenta amostras de *C. striatum* resistente a este antimicrobiano (CRABTREE et al., 2003; SHAH et al., 2005).

Nos artigos 2 (publicado), os ensaios moleculares para detecção da expressão de genes relacionados a multirresistência aos agentes antimicrobianos por 22 amostras de *C. striatum*, representativas dos 10 perfis clonais distintos isoladas do HUPE, demonstraram indícios que sugerem a relação de presença de genes e alterações genéticas no DNA de *C. striatum* no processo de resistência microbiana.

Alguns mecanismos de resistência antimicrobiana foram relatados em espécies de *Corynebacterium*. Sequências codificadoras da subunidade A da enzima girase em amostras de *C. striatum*, *C. amycolatum* e *Corynebacterium macginley* demonstraram que a resistência às fluoroquinolonas está associada a mutações de natureza espontâneas neste gene e depende do número de mutações e o tipo de aminoácido que foi trocado (ALIBI et al., 2017; EGUCHI et al., 2008; SIERRA et al., 2005; YOON et al., 2011;).

Nossos ensaios de PCR detectaram a presença do gene *ermX* (confere resistência a macrolídeos), *aphA* (confere resistência a aminoclicosídeos) e *cmxA* (resistência a clorofenicol) em todas as amostras MDR, PFGE tipos I, II, V, VI, VII, VIII e IX. As amostras com PFGE III, IV e X (1961,1954 e 2376) MDS não expressaram estes genes.

O gene *ermX* pode estar envolvido no fenótipo de resistência à clindamicina e eritromicina (metilação do ribossomo da eritromicina) que codifica a enzima rRNA metilase leva a simultânea resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_B) (FERNANDEZ – NATAL et al., 2016; OLENDER et al., 2013).

Muitos estudos relatam amostras de *C. striatum* resistentes a aminoglicosídeos, conseqüentemente, o uso de aminoglicosídeos como complemento de segunda linha antimicrobiana para tratamento de infecções por *C. striatum* deve ser monitorado. Os mecanismos de resistência a aminoglicosídeos mais comuns são as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME) (NAVAS et al., 2016; NEEMUCHUALA et al., 2018; SHI et al., 2013).

O gene *cmxA*, citado como responsável por codificar a proteína de efluxo do cloranfenicol, foi encontrado em transposons, plasmídeos e genomas de espécies *Corynebacterium* (MOLLMANN et al., 2014; SCHRODER et al., 2012; TAUCH et al., 2008).

Interessantemente, não foi detectada a expressão de nenhum gene de resistência para a amostra 1961/MDS, PFGE III. No entanto, análises *in silico*, baseadas no sequenciamento genômico parcial da amostra realizado neste trabalho e depositado no *Genbank* (**artigo 3**), revelaram a presença do gene *tetB* (gene que confere a resistência a tetraciclina por bomba de efluxo) e *cmxA* (gene relacionado a uma proteína de efluxo que confere resistência a

clorofenicol). Os dados sugerem que por algum motivo, que podem ser fenotípicos ou moleculares, esses genes não são expressos.

No **artigo 2** foi ressaltado que amostras de MDR de *C. striatum* de diferentes perfis clonais estão relacionadas a infecções de corrente sanguínea e infecções associadas ao uso de cateter, similarmente com os achados de Chen e colaboradores (2012). Resultados demonstram que amostras de *C. striatum* isoladas de sangue e segmentos de cateteres não devem ser consideradas meros contaminantes, uma vez que a maioria foi isolada em culturas puras (82%). O isolamento de *C. striatum* em pacientes hospitalizados com sinais e sintomas de infecção foram monitorados de forma esclarecer os indicativos que comprovavam a capacidade de *C. striatum* em se manter presente nos ambientes hospitalares (CAMELLO et al., 2003; MARTINS et al., 2009; SUPERTI et al., 2009).

Devido ao aumento subsequente de casos infecções da corrente sanguínea relacionada a uso de cateter causados por amostras de *C. striatum* no HUPE, foi monitorada a relação clonal dos isolados, revelando a permanência dos perfis PFGE I e II MDR no ambiente hospitalar. No entanto, o perfil PFGE I apresentou maior prevalência entre pacientes com infecções hematogênicas. Novos perfis PFGE MDR (V a IX) foram encontrados associados como agentes etiológicos da corrente sanguínea e relacionados a infecções vinculadas ao uso de cateteres.

Além das alterações genéticas apresentadas por *C. striatum*, as quais lhe conferem a resistência intrínseca, *C. striatum* também vem apresentando outras habilidades que podem favorecer seu estabelecimento e disseminação em ambientes hospitalar. A capacidade de aderir e formar biofilme em diversas superfícies abióticas, independentemente de suas características físico-químicas, como relatado no **artigo 1** parece favorecer a permanência de *C. striatum*.

Os biofilmes bacterianos se formam em associação com muitas atividades humanas, incluindo processamento de alimentos, transporte, infraestrutura pública e, mais importante, cuidados com a saúde (RZHEPISHEVSKA et al. 2013). No presente estudo, biofilmes foram encontrados extensivamente aderidos nas superfícies dos cateteres de poliuretano. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelou uma grande quantidade de biofilme nas superfícies dos cateteres de poliuretano produzidos por todas as cepas de *C. striatum* testadas.

O desenvolvimento do biofilme pode ser dividido em três estágios: fixação inicial, desenvolvimento de formação e disseminação de microcolônia (O'TOOLE et al. 2000). Semelhante a *C. diphtheriae*, como relatado por Gomes e colaboradores (2013), *Acinetobacter baumannii* apresentado por Rao e colaboradores (2008) e outras espécies não diftéricas de *Corynebacterium* (SORIANO et al. 1993), Outros ensaios conduzidos por nossa equipe demonstraram que amostras de *C. striatum* foram capazes de se fixar e formar microcolônias,

uma característica da formação de biofilme, em superfícies abióticas, além de produzir uma grande quantidade de matriz extracelular em superfícies de poliuretano colonizadas *in vitro* e *in vivo*. Foram observados também a presença de *halo voids*, microcanais que possibilitam a passagem de água e nutrientes para as células sésseis bacterianas encontradas nas camadas inferiores do biofilme formado e estão envolvidos na dispersão das células bacterianas sésseis durante o estágio final da formação do biofilme, o que pode aumentar a virulência bacteriana, assim como no estudo realizado por Rice et al. (2009).

Algumas propriedades bacterianas estão associadas à produção de biofilme, incluindo a síntese aumentada de exopolissacarídeos, hidrofobicidade e o desenvolvimento de resistência a antibióticos (COSTERTON et al. 2003; OLSON et al. 2002; RAO et al. 2008). Um estudo anterior demonstrou a influência da carga superficial de um substrato abiótico na morfologia e fisiologia de um biofilme e, assim, na prevenção da formação de biofilmes (RZHEPISHEVSKA et al. 2013).

No estudo apresentado no **artigo 1**, as cepas MDR e MDS *C. striatum* foram capazes de aderir em diferentes níveis às superfícies de plástico com carga negativa (poliestireno) e carga positiva (vidro), como observado anteriormente com outras espécies do gênero *Corynebacterium*, como: *C. diphtheriae* e *C. urealyticum* (GOMES et al. 2013; MATTOS-GUARALDI et al., 1991; 1999; SORIANO et al. 2009). De acordo com observações anteriores de *C. diphtheriae* (GOMES et al., 2013; MATTOS-GUARALDI 1991; MATTOS-GUARALDI et al., 1999), a aderência das amostras de *C. striatum* em superfícies com carga negativa e sua adesão ao poliuretano podem ser parcialmente explicadas pela carga elétrica positiva associada a esse polímero. Além disso, as substâncias de natureza desconhecida amorfas depositadas ou não no glicocálice parece funcionar como um microcimento de *C. striatum* nas superfícies dos cateteres de poliuretano, sugerindo que esta bactéria pode produzir ou atrair substâncias que reforçam sua ligação a superfícies inertes *in vitro*.

A hidrofobicidade tem sido significativamente associada à formação de biofilme de corinebactérias lipofílicas em superfícies sólidas inertes (KWASZEWSKA et al., 2006). Para amostras de *C. diphtheriae* a autoagregação bacteriana e a hidrofobicidade estão relacionadas principalmente à formação de biofilme em superfícies de poliestireno (MATTOS-GUARALDI et al., 1999). Similarmente, amostras de *C. striatum* isoladas do HUPE-UERJ apresentaram alta capacidade de aderir a superfícies de poliestireno mesmo com sua alta hidrofobicidade (**artigo 1**). Portanto, as cepas de *C. striatum* devem ser incluídas entre espécies bacterianas que tendem a aderir às superfícies bióticas e/ou abióticas disponíveis, incluindo dispositivos médicos (por exemplo, cateteres urinários, cateteres venosos centrais e endoscópios). Além disso, a

capacidade das células bacterianas de transferir genes horizontalmente é aprimorada nas comunidades de biofilme, facilitando assim a disseminação da resistência a antibióticos (COSTERTON et al 2001; LEE et al. 2008; STEWART 2001).

Logo, a presença de *C. striatum* pode ter sérias implicações para pacientes imunocomprometidos, especialmente, aos submetidos a procedimentos médicos invasivos, como cateterização e intubação endotraqueais (AL AKHRASS et al., 2012; BROWN et al., 1985, RUSSELL; RUSSELL, 1995, RUTALA et al., 2008). A aquisição da capacidade de formar biofilmes pode representar uma boa estratégia para um microrganismo sobreviver em condições de estresse, por exemplo, durante a invasão ao hospedeiro ou após o tratamento com antimicrobiano.

Os dados obtidos revelaram variações entre a capacidade de diversos clones de linhagens de MDR e MDS *C. striatum* identificadas durante um surto hospitalar no RJ para aderir e sobreviver em superfícies abióticas carregadas positiva e negativamente. No entanto, foi possível estabelecer uma correlação, entre o aumento da formação de biofilme, perfil de multirresistência antimicrobiana e perfil de clonalidade.

A fim de obter outras evidências acerca do potencial patogênico de *C. striatum*, ensaios de interação patógeno-hospedeiro foram adicionalmente realizados in vivo, utilizando como modelo experimental o nematódeo *C. elegans*. Os resultados obtidos foram compilados e publicados no **artigo 4**.

C. elegans tem sido cada vez mais usado como hospedeiro alternativo para estudar fatores de virulência bacteriana, necessários para a avaliação da patogênese em sistemas de mamíferos. O sistema modelo *C. elegans* é baseado em propriedades vantajosas, como vida útil curta, transparência, tratamento genético e facilidade de cultura usando uma dieta de *E. coli* (ANTUNES et al., 2015).

Interessantemente, no presente estudo foi observado que todas as amostras utilizadas de *C. striatum* apresentaram potencial nexo de causalidade entre a morte de *C. elegans* e a infecção por *C. striatum*, independentemente dos perfis clonais e de resistência (MDR e MDS). A patogenicidade foi comprovada, apesar da longa distância evolutiva e as diferenças nas temperaturas de crescimento entre nematoides (20 °C) e mamíferos (37 °C). Embora *C. striatum* cresça preferencialmente a 37 °C, o potencial de virulência também foi verificado na temperatura de crescimento dos nematoides (20 °C). Esta patogenicidade também foi observada no processo de formação de biofilme. No presente estudo, foi verificado que *C. striatum* também possui habilidade de formar biofilme em 20 °C como demonstrado em figuras expostas

no **artigo 4**. Portanto os dados sugerem que a diferença de temperatura não influenciou na produção de biofilme de *C. striatum*.

C. elegans foi usado anteriormente para avaliação da patogenicidade entre espécies de corinbactérias: *C. glutamicum* não patogênico, *C. diphtheriae* potencialmente toxigênico e *C. ulcerans*. No entanto, *C. glutamicum* teve uma influência significativa na sobrevivência de *C. elegans*, diferentemente *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* apresentaram potencial de virulência, causando a morte dos nematoides após a infecção.

Na temperatura de crescimento dos nematoides (20 °C), em 5 dias após a infecção, a sobrevivência dos nematódeos foi reduzida cerca de 20% por *C. glutamicum*, 70% por *C. diphtheriae* e 90% para cepas de *C. ulcerans* (ANTUNES et al., 2015). Os dados publicados no **artigo 4** revelaram diferenças nos níveis de patogenicidade para isolados clínicos de *C. striatum*. Níveis mais altos de patogenicidade foram verificados para as duas amostras que foram capazes de matar completamente os vermes, diferentemente a amostra 1987/I MDR levou a mortalidade de 83% até quatro dias após a infecção, quando comparado aos dados descritos anteriormente para *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* que levaram cinco dias após a infecção para matar parcialmente os vermes.

Estudos anteriores citam uma relação direta entre amostras resistentes e o potencial de virulência de patógenos bacterianos em *C. elegans* (REVELL et al., 2001). Os obtidos no presente estudo indicaram que amostras de *C. striatum* MDR e MDS levaram a 100% de mortalidade dos nematoides, enquanto um nível mais baixo de patogenicidade (83 % de mortalidade de vermes infectados) foi observado para uma cepa de MDR (1987 / I). Portanto, podemos sugerir que os níveis de patogenicidade de *C. striatum* para *C. elegans* não estão diretamente relacionados aos perfis de resistência a múltiplas drogas, em contraste com os dados descritos anteriormente para outros patógenos, incluindo *Klebsiella pneumoniae* (BIALEK et al., 2010)

Uma análise correlativa das características epidemiológicas e moleculares de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina de diversas localizações geográficas, com virulência avaliada por *C. elegans*, indicou que amostras contendo origens genéticas distintas têm desempenho de virulência diferente no modelo experimental *C. elegans*. As atividades nematocidas foram mais altamente correlacionadas com os tipos de SCCmec, spa, MLST e PFGE, sugerindo que o fundo genômico, em vez de uma única característica de exotoxina, foi o preditor mais discriminador de virulência (WU et al., 2013). Embora, os resultados retratados no **artigo 4** demonstrem que todas as amostras testadas de *C. striatum* tenham levado à morte de mais de 60% dos vermes infectados, apenas as amostras de *C. striatum* PFGE-tipo III MDS

e II MDR levaram a 100% de mortalidade dos nematoides. A amostra *C. striatum* 1954 MDS PFGE-tipo IV levou a 87% de mortalidade de *C. elegans*. Curiosamente, a amostra MDR 1987 linhagem PFGE tipo I que apresentou maior capacidade de produção de biofilme nas superfícies de cateteres de poliestireno (37 °C) expressou menor influência na mortalidade de *C. elegans* (20 °C). Portanto, os dados enfatizaram a natureza multifatorial da patogenicidade de *C. striatum*, incluindo mecanismos utilizados por *C. striatum* para matar *C. elegans*.

As amostras de *C. striatum* testadas foram capazes de induzir morfologia de deformação como Dar e Bagging, além da formação de estrela (aglomerados de *C. elegans*), indicando um fenômeno conhecido como comportamento quimiotático negativo de *C. elegans* em relação a *C. striatum*, determinando que amostras de *C. striatum* foram capazes de colonizar e matar *C. elegans* sem nenhum tipo de sinalização de afaste. Em contraste, isolados clínicos de estudos anteriores mostraram que *C. elegans* foi capaz de evitar patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando aprendizado olfativo aversivo (ZHANG et al., 2005).

Adicionalmente, estudos anteriores relataram que os nematoides conseguiram diferenciar entre as corinebactérias potencialmente toxigênicas, como *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, de espécies bacterianas com baixa patogenicidade, incluindo *C. glutamicum* e *E. coli* (ANTUNES et al., 2015). Curiosamente, este comportamento sugere que as amostras de *C. striatum* mostraram um comportamento semelhante ao encontrado anteriormente para a escolha entre *E. coli* OP50 e *C. glutamicum*. Portanto, independente do potencial patogênico de ambas as espécies não toxigênicas, *C. elegans* não foi capaz de usar *C. striatum*, como fonte de alimento.

Fenótipos positivos foram observados um dia após a infecção dos vermes. A formação de estrela-de-verme, Dar e bagging (ensacamento) indica que propriedades distintas, mas gerais, dos membros do gênero podem ser responsáveis pelas alterações, e não por fatores específicos de virulência, assim como o OxyR, que por um mecanismo independente do estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ e a proteína DIP0733 age como um fator de virulência multifatorial que exerce influência na ligação a proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina favorecendo a capacidade de aderir e invadir (ANTUNES et al., 2015).

Verificou-se também que as células epiteliais contribuem para a capacidade de *C. diphtheriae* colonizar e matar o hospedeiro em um sistema modelo de infecção por *C. elegans* (ANTUNES et al., 2015). Portanto, outros fatores de virulência responsáveis por esses sintomas e morte de *C. elegans* devem ser profundamente estudados.

Estudos anteriores demonstraram que *C. elegans* também serviu como um modelo animal simples para estudar interações patógeno-hospedeiro envolvendo biofilme

estafilocócico (BEGUN et al., 2007). Neste mesmo trabalho, foi sugerido que a atividade protetora da matriz de biofilme representa uma antiga e conservada função para resistir à predação. Em contraste, a formação de biofilme de *Bacillus subtilis* aumentou a vida útil de *C. elegans*. *B. subtilis* proficiente em biofilme colonizou o intestino de *C. elegans* e prolongou a vida útil do verme mais do que as cepas isogênicas deficientes em biofilme (DONATO et al., 2017). A capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas por *C. striatum* foi demonstrada anteriormente. A formação de biofilme por *C. striatum* foi encontrada e relacionada com a mortalidade sobre *C. elegans*, em diferentes níveis. A maioria das amostras de *C. striatum* que expressam capacidade de formação de biofilme nas duas temperaturas testadas *in vitro* (37 °C e 20 °C) levou a 87% a 100% de mortalidade dos vermes. Semelhante aos achados com estafilococos, a formação de biofilme pode contribuir para resistir à predação de *C. striatum* por *C. elegans*. Em contraste, com os achados de *B. subtilis*, a formação de biofilme por *C. striatum* não exerceu função para prolongar à vida útil do verme, embora a amostra 1987/I MDR, que apresenta maior capacidade produção de biofilme em diferentes superfícies, tenha apresentado menor capacidade de mortalidade em *C. elegans*. Assim, seria muito superficial considerar que o biofilme possa ter permitido a sobrevivência de *C. elegans*, seguindo mesmo raciocínio do estudo realizado por Donato et al (2007), envolvendo *B. subtilis*.

A exposição a temperaturas próximas a 37 °C em hospedeiros mamíferos geralmente resulta na regulação positiva de uma série de fatores de virulência. No entanto, para alguns patógenos, os fatores de virulência necessários para a colonização e invasão podem ser preferencialmente expressos em temperaturas mais baixas, como mostrado para *Yersinia* spp. (20 °C). Estudos anteriores relataram que *Yersinia* spp. matou *C. elegans* por um mecanismo que se correlaciona com a formação de um biofilme ao redor da região anterior (cabeça) e ao longo da superfície dos nematoides. Verificou-se que esses tipos de fatores de virulência expressos a baixas temperaturas são regulados pelas vias de imunidade inata conservadas em nematoides, pulgas e mamíferos (DARBY et al., 2002; HINNEBUSCH et al., 1996; HINNEBUSCH et al., 2002; JOSHUA et al., 2003).

Os dados mostraram que todas as amostras MDR e MDS de *C. striatum* testadas e de diferentes tipos de PFGE expressaram a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em ambas as temperaturas testadas (20 °C e 37 °C) avaliando se o biofilme pode proteger *C. striatum* contra defesas imunológicas de *C. elegans*, o maior nível de formação de biofilme *in vitro* foi expressa preferencialmente em alta temperatura (37 °C).

A análise comparativa da formação de biofilme em ambas as temperaturas indicou que *C. striatum*, incluindo as amostras que levaram a 100% de mortalidade de *C. elegans*, expressou

níveis mais baixos de produção de biofilme a 20 °C. Curiosamente, foi observado um aumento da formação de biofilme para uma cepa em temperatura mais baixa (20 °C). Os dados indicaram que a exposição a temperaturas próximas a 20 °C pode resultar na regulação negativa de alguns fatores de virulência de *C. striatum*, incluindo a formação de biofilme.

Com os crescentes surtos nosocomiais relacionados a amostras de *C. striatum* multirresistentes a diversos agentes químicos antimicrobianos, ausência de estudos que forneçam informações científicas sobre os fatores de virulência utilizados por *C. striatum* para se manter persistente em ambientes hospitalares e aliado à similaridade composicional da parede celular das micobactérias, explicado por pertencerem a mesma família (actinomicetales) que pode favorecer resistência e/ou tolerância a agentes antimicrobianos. Nos estimularam a investigar o comportamento de *C. striatum* quando tratado com diferentes biocidas utilizado no ambiente hospitalar.

A maioria das bactérias pertencente à família *Actinomycetales* se apresenta ramificada, filamentosa, com características fisiológicas em comum com membros dos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium*, em particular com base em seus componentes da parede celular, lipídios do envelope celular e composições do peptidoglicano (PARTE et al., 2018).

Estudos relataram que amostras de *Mycobacterium* spp. apresentam tolerância a agentes biocidas de alto nível, como glutaraldeído (DUARTE; LORENA; PITOMO et al., 2009). Neste sentido, investigamos a capacidade de amostras multirresistente de *C. striatum*, produtoras de biofilme e que exercem virulência em *C. elegans*, de tolerar e/ou resistir a ação dos principais biocidas utilizados em ambiente hospitalar.

Cada vez mais a atenção está sendo direcionada para as respostas dos biocidas (desinfetantes e antissépticos), em especial os de escolha em ambiente de assistência à saúde para controle microbiológico. O uso inadequado, aliado ao despreparo das equipes multidisciplinares envolvidas no processo de controle as infecções hospitalares, possibilitam o aparecimento de microrganismos resistente e/ou tolerante aos diversos tipos de antimicrobianos. Diferentes grupos de bactérias variam na sua susceptibilidade aos biocidas, como: as espécies formadoras de esporos, seguidas do gênero *Mycobacterium* e algumas espécies de bactérias Gram-negativas.

São escassos os trabalhos relatando a resistência a agentes biocidas em corinebactérias. Corinebactérias estão listadas entre os microrganismos resistentes detectados em ensaios de análise de eficiência de protocolos de desinfecção utilizados em instrumentos e ambientes de assistência à saúde, especialmente as espécies *C. striatum* e *C. amycolatum*. Corinebactérias foram detectadas após o reprocessamento de endoscópios gastrointestinais submetidos à

desinfecção com soluções de ácido peracético a 2% ou glutaraldeído a 2%, por períodos de exposição de até 30 minutos (RIBEIRO et al., 2011).

Ensaio comparativos entre diversos agentes biocidas, demonstraram a atividade microbicida, *in vitro*, da povidone iodine a 5%, do digluconato de clorexidina a 4% e do ácido hipocloroso a 0,01% para *C. striatum* e *C. amycolatum*, indicando seu uso na antisepsia pré-operatória (ANAGNOSTOPOULO et al., 2018).

Nas superfícies corpóreas (pele, conjuntiva ocular e mucosas) submetidas a procedimentos pré-operatórios tratadas com solução de clorexidina 0,05% a 0,5%, foi observada redução significativa do isolamento de corinebactérias, contudo não houve efeito microbicida esperado para este agente *in vivo* (GILI et al., 2018).

Recentemente, em análise comparativa da eficiência de desinfecção entre duas associações de biocidas (clorexidina 0,5% /álcool etílico 70% *versus* iodine 1%/álcool etílico 70%) utilizadas em cirurgias ortopédicas, corinebactérias foram identificadas entre os microrganismos isolados da superfície da pele após o processamento (SHADID et al., 2019).

A limpeza mecânica com água e sabão, realizada manualmente com auxílio de escova e com uso de equipamento de proteção individual (EPI), visa a remoção de todo material orgânico e a redução dos microrganismos presentes nos materiais cirúrgicos, para que não haja a interferência na atividade antimicrobiana dos desinfetantes, ou não constitua uma barreira física de proteção aos microrganismos durante os processos de desinfecção e esterilização por meios físicos e químicos. A limpeza meticulosa dos materiais cirúrgicos, antes de submetê-los à desinfecção ou esterilização é um procedimento unânime e universal (SOUZA et al., 1998)

A maioria das espécies Gram-positivas possuem alta concentração de lipopolissacarídeo (LPS), lipídios com perfil hidrofóbico muito intenso, conferindo propriedades favoráveis a tolerância aos agentes químicos hidrofílicos e de adesividade a superfícies hidrofóbicas. Adicionalmente, mecanismos de adesividade e persistência apresentados por microrganismos, especialmente sob condições de estresse, como a expressão de adesinas e invasinas, enzimas capazes de neutralizar a ação de agentes oxidantes e sequestrar micronutrientes e a habilidade de produzir biofilme colaboram para a resistência a ação de agentes biocidas. (COSTERTON et al., 1999 e 2003)

A aquisição de genes de resistência através de transferência genética, mecanismos de bombeamento de substâncias químicas para fora do citoplasma bacteriano (bombas de efluxo), alterações nas proteínas de grande peso molecular encontradas na membrana externa de bactérias (canais de porinas), canais estes que favorecem a entrada de substâncias para as células, composição da membrana bacteriana, composta por lipídeos e peptidoglicanos que

são bastante impermeáveis, são fatores que podem influenciar a ação dos agentes químicos nos processos de desinfecção (SVETLÍKOVÁ et al., 2009)

Antissépticos e desinfetantes são usados extensivamente em hospitais e outros centros de saúde para uma variedade de aplicações tópicas e de superfícies duras. Em particular, eles são uma parte essencial das práticas de controle de infecção e auxiliam na prevenção de infecções nosocomiais. Uma ampla variedade de agentes químicos ativos têm sido usada como biocida por centenas de anos para antisepsia, desinfecção e preservação. Apesar disso, pouco se sabe sobre o modo de ação dos biocidas comparado com os principais antibióticos de uso clínico. Em geral, os biocidas têm um espectro de atividade mais amplo que os antibióticos e, embora os antibióticos tendam a ter alvos intracelulares específicos, os biocidas podem ter múltiplos alvos. O uso generalizado de produtos antissépticos e desinfetantes levou a algumas especulações sobre o desenvolvimento da resistência microbiana, em particular a resistência cruzada aos antibióticos (RUSSELL et al., 1994).

A desinfecção e a esterilização são essenciais para garantir que os instrumentos médicos e cirúrgicos não transmitam patógenos infecciosos aos pacientes, profissionais médicos e ambientes hospitalares. A falha em desinfetar ou esterilizar adequadamente o equipamento acarreta não apenas no risco associado à violação das barreiras do hospedeiro, mas também no risco de transmissão de pessoa para pessoa e transmissão e troca de material genético entre patógenos ambientais (MORAES et al., 1997; MORENTE et al., 2013; SMITH et al., 2008).

Formas de bactérias sésseis associadas ao biofilme são geralmente mais resistentes à morte do que as bactérias que crescem sob condições planctônicas (PITOMBO et al., 2009). Biofilmes bacterianos desempenham um papel importante no ambiente nosocomial, protegendo os microrganismos contra ação dos antibióticos e biocidas. Biocidas são aliados importantes não apenas para erradicação das bactérias em seu estado planctônico, mas também aos biofilmes, já que os antibióticos isolados não conseguem destruir a matriz persistente do biofilme (MORENTE et al., 2013; SOUZA et al., 1998; SMITH et al., 2008). Os biocidas têm sido usados atualmente para controlar e inativar biofilmes, embora a tolerância a alguns biocidas possa diminuir a eficácia da desinfecção. Por conta disso, a avaliação da suscetibilidade a antissépticos e desinfetantes tem sido cada vez mais investigada (MORAES et al., 1997; SMITH et al., 2008; MORENTE et al., 2013).

Estudos anteriores destacaram a importância da formação de biofilme para o potencial infeccioso e para tolerância a biocidas por amostras de *Mycobacterium* spp. e outros patógenos bacterianos (MORENTE et al., 2013; MORAES et al., 1997; LORENA; PITOMBO et al., 2009; SMITH et al., 2008). Alguns patógenos, como *Listeria monocytogenes*, foram

apresentados como capazes de se adaptar a estresses ambientais mantendo sua viabilidade em biofilmes. Esta capacidade compromete a segurança dos ambientes contra os microrganismos, uma vez que, as células aderidas podem ser resistentes aos biocidas, tornando-se mais difíceis de detectar e, conseqüentemente, eliminar (RATTI et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram que infecções bacterianas adquiridas em ambiente hospitalar podem estar associadas a dispositivos médicos, como ventiladores, cateteres, fios esterno cirúrgicos e tubos endotraqueais (WONG et al., 2010). Interação e persistência de amostras de *C. striatum* MDR e MDS com superfícies de dispositivos médicos semicríticos e críticos, como cateteres e tubos endotraqueais, foram confirmados no **artigo 1**. *C. striatum* apresentou a afinidade tanto para superfícies de compostos abióticas hidrofílicas carregadas positivamente quanto para hidrofóbicas com carga negativa. A amostra 1987 / I MDR foi a que apresentou maior capacidade de produção de biofilme em superfícies de vidro, poliuretano e poliestireno (**artigo 1**). Neste estudo foram reafirmadas que todas as amostras de *C. striatum* testadas apresentaram habilidade de formar biofilme, independentemente do substrato testado, incluindo metal cirúrgico material não testado no estudo do **artigo 1**. *C. striatum* MDR 1987 / I, assim como já apresentado no **artigo 1**, apresentou maior aderência, obtendo maiores números de CFU recuperados do biofilme associado à maioria dos substratos testados. Embora todas as amostras de diferentes tipos de PFGE tenham sido capazes de formar biofilme em todos os substratos avaliados, a amostra 2396 / II MDR isoladas de secreção traqueal interessantemente, apresentou pouca aderência ao metal, diferentemente da amostra 1961 / III MDS, de urina, que apresentou maior aderência ao metal cirúrgico. Os mecanismos que influenciam na capacidade de *C. striatum* aderir a diferentes superfícies abióticas em níveis variados permanecem desconhecidos.

Estudos adicionais realizados pela nossa equipe demonstraram que determinantes composicionais também foram detectados através de ensaios importantes que serão publicados adiante, como a natureza da composição do biofilme formado por *C. striatum*, além da, interação com células monocíticas U-937 que interessantemente, foram intensificadas pela presença de proteínas de plasma humano assim como aconteceu com formação de biofilme foi aumentada na presença de fibrinogênio (**artigo 01**).

Outros ensaios utilizando proteinase K, metaperiodato de sódio, meios de cultura com vermelho do congo evidenciaram a grande quantidade de proteína e polissacarídeos no biofilme de *C. striatum*, confirmadas por imagens relevantes de MEV e Microscópio eletrônico especiais com ajuda de reagente separadores por afinidade como safranina (proteína) e comassie blue (carboidrato).

Novas análises moleculares determinaram a presença de genes de resistência a antibióticos e de aderência que podem justificar o perfil MDR de prevalência no HUPE e a alta capacidade de aderir e formar biofilme em diferentes superfícies. Enfim, todos os resultados obtidos possuem correlações fenotípicas, bioquímicas, moleculares e principalmente epidemiológicas. O entendimento que obtivemos no estudo de rastreamento epidemiológico a partir das amostras de *C. striatum* isolados do surto divulgado por Baio e colaboradores (2013), nos fornece evidências clínicas e laboratoriais sobre a natureza multifatorial de *C. striatum*.

O uso irracional de produtos antissépticos e desinfetantes levou a algumas investigações sobre o desenvolvimento de resistência microbiana, em particular a resistência cruzada a antibióticos, tolerância a biocidas de formas planctônicas e associadas ao biofilme de *C. striatum*.

A presença de dispositivos médicos e a exposição a antimicrobianos podem possivelmente possibilitar a infecção do trato respiratório inferior humano por *C. striatum*. Como já mencionado, Baio e colaboradores (2013) relataram a presença de amostras MDR de *C. striatum*, sendo que a maioria dos pacientes apresentava infecção do trato respiratório inferior (64%), recebendo também suporte ventilatório (89%). A análise de PFGE confirmou o isolamento de um único clone de *C. striatum* MDR (PFGE I) isolado do trato respiratório inferior. No entanto, poucas pesquisas sobre a eficácia de desinfetante em dispositivos e aparelhos médicos contaminados por *C. striatum* são encontradas na literatura. No Japão, Wong e colaboradores (2010) também mostraram que *C. striatum* pode ser responsável por infecções respiratórias graves adquiridas no hospital (empiema, pneumonia ou bronquite aguda) e pneumonia adquirida na comunidade, apenas 50% dos pacientes que receberam antibióticos ativos contra esse patógeno sobreviveram à infecção, a maioria dos pacientes receberam suporte ventilatório com ventiladores não invasivos e / ou ventiladores mecânicos invasivos.

Entre as opções eficazes para a desinfecção de dispositivos médicos semicríticos sensíveis à temperatura, o GA continua sendo o desinfetante químico mais amplamente utilizado em hospitais em todo o mundo devido à sua atividade micobactericida eficaz e custo relativamente baixo. No Canadá, as instruções de uso de do produto que continha 2% de GA indicou que os itens a serem desinfetados devem ser imersos completamente por um período mínimo de 10 minutos a 20 °C para destruir organismos vegetativos, incluindo *P. aeruginosa*; para 100% de morte de *M. tuberculosis*, o tempo de contato recomendado no rótulo é de 45 minutos a 25 °C (JOHN et al., 1993). Relatórios recentes sugeriram, no entanto, que as micobactérias de crescimento rápido (*Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium massiliense*) foram isoladas com crescente frequência de dispositivos médicos

processados com GA, incluindo endoscópios, apresentando fatores associados ao desenvolvimento de resistência ao GA, desinfetante mais usado em unidades de endoscopia. Sua eficácia vem aliada a algumas desvantagens, como o fato de danificar endoscópios por corrosão, acessórios ou equipamentos de processamento automatizado (PITOMBO; LORENA 2009; WERTH et al., 2016).

Mecanicamente, acredita-se que o GA atue pela oxidação de grupos sulfidrilas presentes nas proteínas e oxidação dos lipídios na superfície externa da célula. Espécies bacterianas resistentes ao GA têm sido crescentemente descritas na literatura. Amostras de *P. aeruginosa* oriundas de surto e isoladas de endoscópios apresentaram perfil associado a um padrão de resistência indicando o envolvimento de fatores genéticos. A adaptação fenotípica, os efeitos físicos de proteção aos fatores genéticos têm sido considerados mecanismos relevantes para a resistência ao GA nas formas bacterianas planctônicas e sésseis (VIKRAM et al., 2015). Existe, portanto, alguma preocupação de que o uso generalizado de GA em ambientes clínicos selecione populações de bactérias resistentes a este biocida, com possíveis consequências na resistência cruzada a vários antibióticos, ocasionando grande impacto na patogenicidade bacteriana (SVETLÍKOVÁ et al., 2009).

Embora GA tenha sido retirada do uso em alguns países como esterilizante químico (REY et al., 2011), ele continua sendo um biocida comumente usados para controlar o crescimento microbiano em hospitais, tratamento de água, produção de alimentos e indústrias, incluindo no Brasil (Mello 2007 – Anvisa Nota 04/2007). Coletivamente, esses estudos sugerem regulação genética, possivelmente multifatorial, da resistência ao GA em bactérias, no entanto, o mecanismo não é claro. Dado que o GA é um biocida amplamente utilizado, elucidacões acerca da resposta de biofilme microbiano ao GA tornam-se necessárias para informar a aplicação adequada do biocida. Costerdom e Ceri (2012) já afirmavam que bactérias em biofilmes demonstram maior resistência antimicrobiana em comparação com as células planctônicas, por a adaptação fenotípica e efeitos de proteção física se baseando na resistência à GA. No **artigo 5**, relatamos o efeito da exposição à GA nas formas planctônicas e sésseis (em biofilme) de *C. striatum*. Os resultados demonstraram que procedimentos de desinfecção de alto nível com GA (exposição do GA 2% durante 30 min) reduziu significativamente o número de bactérias viáveis associadas ao biofilme em todos os substratos testados, no entanto, a sobrevivência das formas sésseis foi 100% superior às formas planctônicas de *C. striatum*. A tolerância ao GA foi observada para as formas planctônicas e sésseis independente dos perfis clonais e de suscetibilidade antimicrobiana (MDR e MDS). Curiosamente, as formas

planctônicas da cepa MDS 1961 / III permaneceram vivas até o tratamento com GA a 2% (30 min).

A atividade antimicrobiana pode ser influenciada por muitos fatores, como efeitos de formulação, sinergia, temperatura, diluição, método de teste e / ou presença de uma carga orgânica (MCDONNELL et al., 1999). A matéria orgânica na forma de soro, sangue, pus, material fecal ou lubrificante, podem interferir na atividade antimicrobiana de biocidas de pelo menos duas maneiras. Mais comumente, a interferência ocorre por uma reação química entre o germicida e a matéria orgânica, que resulta em um complexo menos germicida ou não germicida, deixando menos do princípio ativo disponível para atacar os microrganismos.

Como uma boa alternativa, o material orgânico pode proteger os microrganismos do ataque, agindo como uma barreira física, duração a exposição os microrganismos podem ser protegidos dos desinfetantes pela produção de massas espessas de células e materiais extracelulares nos biofilmes (COSTERDON 2012).

A Diretriz para desinfecção e esterilização em unidades de saúde descreve que o uso de soluções baseadas em GA nestes locais é generalizado devido às suas vantagens, incluindo excelentes propriedades biocidas; atividade na presença de matéria orgânica (20% de soro bovino) e ação não corrosiva para equipamentos críticos, semicríticos e não críticos, como: endoscópicos, termômetros, borracha ou equipamentos de plástico (RUTALA et al., 2008). No presente estudo foi constatado que a presença de matéria orgânica (BSA 2%) foi capaz de aumentar a tolerância ao tratamento com GA (30 min) por amostras de *C. striatum*, independentemente do sítio de isolamento, perfis de PFGE e resistência (MDS e MRD). Além disso, a sobrevivência das formas sésseis foi significativamente maior do que as formas planctônicas durante o tratamento com GA (30 min) na presença de BSA a 2%. Biofilmes de isolados clínicos de MDR do tipo PFGE I responsáveis principalmente por surto hospitalar brasileiro e predominantemente isolados de pacientes submetidos à intubação endotraqueal (BAIO et al., 2013) mostraram tolerância a 2% de GA em níveis mais altos também na presença de matéria orgânica (BSA a 2%) nas superfícies abiótica - vidro (hidrofílica) e poliestireno (hidrofóbica). Os mecanismos que influenciam a capacidade de *C. striatum* de aderir a diferentes materiais hidrofílicos e hidrofóbicos com diferentes intensidades permanecem desconhecidos.

Para dispositivos médicos críticos, a esterilização e a desinfecção de alto nível são obrigatórias. Por esse motivo, também foi investigado o PA, um desinfetante altamente eficaz que pode ser uma alternativa ao GA (DUNOWSKA et al., 2008). No entanto, o uso do PA pode levar a custos mais altos, incluindo custos de processamento, compra, treinamento, instalação

e reparo do endoscópio. Embora este produto seja rapidamente eficaz contra uma ampla variedade de microrganismos, mancha o metal dos endoscópios e tem instabilidade baixa, resultando em uma vida útil de apenas 24 horas após diluição. As vantagens especiais do PA são a falta de produtos de decomposição prejudiciais (ácido acético, água, oxigênio, peróxido de hidrogênio) que aumentam a remoção de material orgânico e não deixam resíduos. Permanece eficaz na presença de matéria orgânica, é esporocida, mesmo a baixas temperaturas, embora cause corrosão em cobre, latão, bronze, aço comum e ferro galvanizado. Entretanto, esses efeitos podem ser reduzidos por aditivos e modificações de pH. Para procedimentos de desinfecção de alto nível, o PA pode ser usado em concentrações variáveis durante 12 a 30 minutos de tempo de exposição a ≥ 20 ° C. Um desinfetante alternativo de alto nível disponível no Reino Unido contém 0,35% de PA (RUTALA et al., 2008).

Todas as amostras testadas de *C. striatum* MDR e MDS, de diferentes tipos de PFGE, apresentaram tolerância até 1 minuto de exposição à solução de PA imediatamente preparada em alta concentração (2%). Ao contrário dos dados descritos anteriormente por Rutala (2008), a presença de BSA a 2% aumentou a tolerância de todos os MDR e MDS *C. striatum* testados em diferentes níveis, incluindo a cepa MDS 1961 / III de 1 a 4 min.

O Virkon (VK) é um desinfetante multiuso, normalmente utilizado para limpar derramamentos perigosos, desinfetar superfícies e equipamentos de imersão. A solução é usada em muitas áreas, incluindo hospitais, laboratórios, instalações odontológicas e veterinárias e em qualquer outro lugar onde o controle de patógenos são necessários. Estudos anteriores confirmaram a atividade bactericida de produtos VK contendo monopersulfato de potássio como seu principal ingrediente ativo, incluindo *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Diferentemente, o VK não demonstrou eficácia contra alguns patógenos bacterianos, como *Helicobacter pylori* e *L. monocytogenes* e, conseqüentemente, não foi aprovado para uso na Califórnia (MARTIN et al., 2013; MATSUOKA et al., 2017).

Matsuoka e colaboradores (2017) descreveram que VK a 1% foi utilizado para desinfetar instrumentos cirúrgicos. Os resultados obtidos revelaram que a eficácia do VK está vinculada com a utilização adequada. Neste caso, o VK não danificou os instrumentos. Os instrumentos não devem ser deixados na solução VK por mais de 10 minutos. A superexposição de uma solução com materiais orgânicos ou instrumentos metálicos pode causar a perda da atividade oxidante em um tempo menor. A solução VK foi projetada para durar pelo menos 1 a 2 semanas (MATSUOKA et al., 2017). Até o presente momento, dados sobre a eficácia de

compostos de peróxido e mecanismos envolvidos na inativação das espécies *Corynebacterium* não foram encontrados na literatura.

As soluções de hipoclorito de sódio (SH) são desinfetantes com amplo espectro antimicrobiano e amplamente utilizado para superfícies duras e derramamentos de sangue humano (RUTALA et al., 2008). No entanto, por razões como a corrosão de superfícies metálicas e outros equipamentos, geração de gás irritante e gerenciamento complicado de concentrações necessitando de mão de obra capacitada são características que desfavorecem a utilização de SH. Por outro lado, desinfetantes e agentes de limpeza formulados com VK melhoram a ação desinfetante e a limpeza à base de cloro. Adicionalmente, foi relatado que, com o ácido hipocloroso como substância ativa, há pouca corrosão do metal e nenhum odor de cloro, sendo esse agente altamente eficaz contra muitos organismos infecciosos.

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) afirma que desinfetantes à base de monopersulfato de potássio (PPD) e SH são amplamente eficazes contra organismos como o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). As diretrizes dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomendam a seleção de um desinfetante ou limpador / registrado na EPA para uso em manutenção ambiental (MASSUDA et al., 2018). Além disso, as diretrizes japonesas de diálise recomendam o uso de VK na limpeza e desinfecção de superfícies ambientais.

No estudo descrito no **artigo 5**, 1% de VK e 1% de hipoclorito de sódio foram testados contra formas planctônicas de *C. striatum*. No geral, ambos os biocidas foram eficazes porque células bacterianas viáveis não foram detectadas após 1 ou 2 min de incubação. No entanto, é importante salientar que o VK24h foi mais eficaz que o VK48h, pois as células bacterianas viáveis detectadas após a exposição ao VK48h foram pelo menos duas vezes superior às observadas após o tratamento com VK24h.

Os álcoois exibem atividade antimicrobiana rápida e de amplo espectro contra bactérias vegetativas, incluindo micobactérias (RUTALA et al., 2008). Devido à falta de atividade esporocida, os álcoois não são recomendados para esterilização, mas são amplamente utilizados para desinfecção de superfícies duras e antisepsia da pele. Concentrações mais baixas também podem ser usadas como conservantes e para potencializar a atividade de outros biocidas. Muitos produtos alcoólicos incluem baixos níveis de outros biocidas (em particular a clorexidina), que permanecem na pele após a evaporação do álcool, ou excipientes (incluindo emolientes), que diminuem o tempo de evaporação do álcool e podem aumentar significativamente a eficácia do produto. No entanto, a eficácia depende das concentrações do agente ativo e do microrganismo de teste. Por exemplo, o álcool isopropílico tem propriedades lipofílicas maiores que o álcool

etílico que é menos ativo contra patógenos hidrofílicos. Geralmente, a atividade antimicrobiana de álcoois é significativamente menor em concentrações abaixo de 50% e apresenta faixa ideal de 60 a 90%. Pouco se sabe sobre o modo de ação específico dos álcoois, mas com base no aumento da eficácia na presença de água; acredita-se geralmente que eles causam danos à membrana e desnaturação rápida de proteínas, com subsequente interferência (RUTALA et al., 2008).

O álcool etílico (EtOH) 70% é amplamente utilizado para antissepsia de pele e dedinfecção de instrumentos. Atualmente, as formas planctônicas de todas as cepas de *C. striatum* testadas apresentaram tolerância a EtOH 70% durante 1 min de exposição. Para *C. striatum*, observações gerais demonstraram que a cepa 1961 / III MDS apresentou a maior resistência à maioria dos biocidas testados, enquanto a cepa 1954 / IV é a cepa mais sensível, com exceção dos tratamentos 2% GA e EtOH 70%.

A maioria dos dispositivos médicos invasivos de uso crítico é revestida com matéria orgânica, o que pode contribuir para a redução do efeito dos biocidas e favorecer a sobrevivência bacteriana (RUTALA et al., 2008). Além dos resultados atualmente demonstrados com GA, a presença de matéria orgânica foi capaz de influenciar o efeito dos quatro outros biocidas testados em formas planctônicas de *C. striatum*. Como esperado, a presença de BSA a 2% aumentou a sobrevivência bacteriana de todos os biocidas testados, especialmente VK (de 4 a 20 min) e álcool (de 1 a 30 min).

Todos os resultados apresentados nesta pesquisa enfatizam a natureza multifatorial dos fatores de virulência de *C. striatum*, retratando seu potencial de patogenicidade. Outros estudos já estão em desenvolvimento, novos resultados apresentam dados que fortalecem a preocupação quanto a problemática exercida por este patógeno emergente que se agrava pelo negligenciado e subestimação das equipes de saúde. Trabalhos expostos pelos artigos em fase de redação, parcialmente descritos, em anexo trazem resultados que reforçam o potencial de virulência os quais levam *C. striatum* a se manter persistente em ambientes hospitalares.

CONCLUSÕES

a) Foram isolados 334 bacilos Gram-positivos irregulares durante o período de maio 2009 a outubro de 2018 no HUPE-UERJ;

b) A espécie *C. striatum* (n=112) apresentou maior prevalência dentro das demais espécies de corinebactérias isoladas no HUPE-UERJ, independentemente do método de identificação fenotípico ou genotípico empregado;

c) Os resultados demonstraram que métodos genotípicos e proteômicos devem ser empregados como primeira escolha em rotina de diagnósticos laboratorial hospitalar quando os recursos financeiros assim permitirem, particularmente em países em desenvolvimento, devido as suas susceptibilidade e especificidade;

d) Esquema de triagem desenvolvido no LDCIC utilizando os testes fenotípicos de susceptibilidade ao agente víbrio - estático O/129, tirosina e CAMP, demonstrou eficácia na identificação das corinebactérias pertencente ao complexo X SMA, em especial *C. striatum*, apresentando-se como um método alternativo eficaz para o diagnóstico laboratorial desse patógeno em regiões com dificuldade sócia econômica;

e) As amostras de *C. striatum* em sua maioria foram isoladas de setores hospitalares importantes como: Unidade de Terapia Intensiva geral e de transplantes, pacientes internados, predominantemente submetidos a procedimentos invasivos como intubação endotraqueal e cateterização. As amostras de *C. striatum* isoladas do trato respiratório como: aspirado traqueal, secreção nasofaringe e lavado bronco alveolar além de sangue e cateter, apresentaram maior índice de isolamento;

f) A maioria das amostras de *C. striatum* isoladas do HUPE-UERJ apresentaram altos níveis de resistência ($\geq 80\%$) a antimicrobianos frequentemente usados no tratamento de infecções gram-positivas, especialmente clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina e penicilina, sendo 89,28% das amostras de *C. striatum* isolados do HUPE – UERJ (n=100/112) caracterizadas como MDR. Os agentes antimicrobianos linezolid, vancomicina e tetraciclina apresentaram o menor nível de resistência por *C. striatum*;

g) As amostras de *C. striatum* foram capazes de expressar vários genes relacionados à resistência à tetraciclina, clorafenicol e eritromicina e pode explicar os altos níveis de resistência observados para estes e outros antibióticos;

- h) No presente estudos foram identificados seis novos perfis clonais (V, VI, VII, VIII, IX e X) além dos clones I, Ia, Ib, II, III e IV inicialmente detectados no surto nosocomial ocorrido no HUPE-UERJ em 2009. Os perfis de PFGE I e II permaneceram prevalentes dentre os isolados de *C. striatum* do HUPE-UERJ;
- i) Amostras de *C. striatum* com PFGE I, II, V, VI, VII, VIII, IX apresentaram perfil de resistência (MDR) sendo sensíveis apenas vancomicina, linezolida e tetraciclina, diferente mente das amostras PFGE III, IV e X que apresentaram suscetibilidade (MDS) a maioria dos antimicrobianos testados apresentando resistência somente tetraciclina e ampicilina;
- j) Interessantemente, ensaios de PFGE realizados em outra unidade Hospitalar (HCE) em amostras MDR de *C. striatum* isoladas de sítios respiratórios, apresentaram perfil clonal (Ic), similar, aos clones também detectados HUPE-UERJ;
- k) As amostras pertencentes aos diferentes pulsotipos foram isoladas de espécimes clínicos diversos: trato respiratório, sangue e cateter, exceto os PFGE III e IV, que foram isoladas respectivamente em urina e secreção de ferida;
- l) As amostras isoladas de sítios relacionados ao trato respiratório, sangue e cateter apresentaram maior índice de isolamento no período temporal deste estudo;
- m) Os ensaios dos perfis de virulência permitiram concluir que amostras de *C. striatum* expressam diversidade no potencial de virulência independente dos perfis clonais e de resistência aos agentes antimicrobianos;
- n) As amostras de *C. striatum* dos perfis clonais (PFGE) e de resistência (MDR e MDS) foram capazes de produzir biofilme maduro em diversas superfícies abióticas hidrofílicas e hidrofóbicas, incluindo poliuretano e cloreto de polivinila (PVC), importantes materiais utilizados na indústria para fabricação equipamentos médicos invasivos, como cateteres e tubos endotraqueais independente das características físico-químicas e polaridade do substrato;
- o) A afinidade de *C. striatum* por fibrinogênio humano e outras substâncias, como colágeno, fibronectina e ferro, favoreceram a produção de biofilme de *C. striatum*, sugerindo serem determinantes no potencial de virulência deste patógeno nos hospedeiros humanos;
- p) A capacidade de produzir biofilme em diferentes substratos in vivo e in vitro contribui para o estabelecimento e a disseminação de infecções causadas por *C. striatum*, principalmente em pacientes internados submetidos a procedimentos invasivos;
- q) Vários eventos como a aderência em substratos bióticos e abióticos, incluindo proteínas plasmáticas, proteínas da matriz extracelular e dispositivos médicos invasivos, sugerem favorecer as fases preliminares da infecção e disseminação hematogênica por *C. striatum*;

r) A alta habilidade de produzir biofilme em poliuretano (cateter) PVC (tubo endotraqueal) favorece persistência e disseminação de *C. striatum* em ambiente hospitalar e isso se agrava pelo fato de *C. striatum* ser capaz de utilizar de substâncias oriundas de componentes celulares, extracelulares e hematogênicos, para favorecer seu crescimento, persistência, disseminação e proteção de agentes químicos externos além da sua alta capacidade de provocar alterações sanguíneas e morfológicas em seu hospedeiro;

s) Além de agentes antimicrobianos utilizados na antibiótico terapia, estruturas de biofilmes formados por *C. striatum* podem apresentar resistência e/ou tolerância a múltiplos biocidas (antissépticos e/ou desinfetantes). A elevada capacidade de colonização de *C. striatum* combinada com sua resistência e ou tolerância a diferentes biocidas pode contribuir para a sobrevivência e maior disseminação desse patógeno no ambiente hospitalar;

t) Os ensaios de susceptibilidade aos agentes biocidas demonstraram que as amostras *C. striatum* apresentaram tolerância nas formas sésseis e planctônicas a produtos químicos antimicrobianos, incluindo antissépticos e agentes de desinfecção de alto nível. No entanto, a sobrevivência das formas sésseis foi pelo menos 100% maior que as formas planctônicas para todas as cepas testadas de *C. striatum* de diferentes tipos de PFGE;

u) Interessantemente uma amostra de *C. striatum* MDS (1961) PFGE III apresentou maior tolerância os agentes biocidas testados, quando comparadas com demais amostras, incluindo as MDR, chegando a suportar o tratamento de glutaraldeído a 2% por um período de até 30 minutos, período esse que é considerado padrão para desinfecção de alto nível;

v) A presença de matéria orgânica (BSA) contribuiu para o processo de tolerância de *C. striatum* aos agentes biocidas, uma vez que foi observado um aumento 125% da sobrevivência quanto tratados com BSA e biocidas;

w) *C. striatum* exerceu potencial de virulência em *C. elegans*, provocando diversas alterações morfológicas, entre elas DAR, bagging e formação de estrela. *C. striatum* é capaz de matar *C. elegans* independente do perfil clonal e resistência, sítio, local de isolamento e capacidade de produzir biofilme. No entanto, não são capazes de repelir (quimiotaxia positiva) os nematoides *C. elegans* nos meios de cultura;

x) Amostras de *C. striatum* foram capazes de sobreviver e produzir biofilme maduro e em fragmentos de cateter de poliuretano no interior de camundongos e cobaia, resistindo à ação das células de defesa e formando um complexo biofilme, com extrema quantidade de material extracelular, indicando que o biofilme de *C. striatum* é favorecido por diferentes substâncias oriundas do hospedeiro;

y) Amostras de *C. striatum* foram capazes de induzir alterações hematológicas em camundongos e cobaias, sugerindo que alterações hematológicas como: trombocitopenia e a presença de agregados plaquetários observadas no estudo podem ser de origem patológica, indicando reação inflamatória e/ou infecciosa por *C. striatum*;

z) Os estudos internacionais corroboram a natureza multifatorial da patogenicidade de *C. striatum*, demonstrada neste estudo, ressaltando que amostras de *C. striatum* não podem ser subestimadas tanto pelos profissionais da área clínica quanto pelos microbiologistas.

REFERÊNCIAS

- ABALLAY A., YORGEY P, AUSUBEL F.M. Salmonella typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 2000; 10:1539 -1542.
- ADDERSON E.E., BOUDREAUX J.W., HAYDEN R.T. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Ped. Infec. Dis J.* 2008; 27:136 -138.
- AL AKHRASS F., et al., Rhodococcus bacteremia in cancer patients is mostly catheter related and associated with biofilm formation. *PLoS ONE.* 2012; 7:32945.
- ALATOOM A.A., et al. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:160-3.
- ALIBI S., et al., Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports.* 2017; 017:10081.
- ALMIRANTE B, MIRÓ J.M. Infecciones asociadas a las válvulas protésicas cardíacas. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2008;26(10):647-64.
- ÁLVAREZ G.P., et al., Eficacia biodescontaminante obtenida mediante la aplicación de virkon®, perasafe® e hidróxido sódico sobre superficies de Alto riesgo microbiológico. *Rev.Comp.de Cien.Vet.* 2011; 5:132-144.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS* – International. 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA. 2008; 19428-2959-ASTM E 2315 – 03.
- ANAGNOSTOPOULOS A.G, et al., 0.01% Hypochlorous Acid as an Alternative Skin Antiseptic: An In Vitro Comparison. *Dermatol Surg* 2018; (44):1489–1493.
- ANDRADE D., et al., Álcoois: A produção do conhecimento com ênfase na sua atividade antimicrobiana. *Revista Medicina. Ribeirão Preto:* vol 35, n 1, jan/mar, 2002.
- ANDRADE N.J., PINTO C. L.O., LIMA J.C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: *O uso de compostos clorados na indústria de laticínios. Inf. Agropec.* 1988; 155: 48-52
- ANTUNES C.A., et al. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with *Corynebacterium* *Microbiology research.* 2016; 162:84-93.
- ANTUNES C.A, et al. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology* 2015; 161:639–647.
- ANVISA - Resolução da Diretoria Colegiada n. 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. ANVISA; 2010.

ANVISA - Resolução da Diretoria Colegiada n. 8, de 27 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido - MCR em serviços de saúde. ANVISA; 2009.

ANVISA - Resolução RDC n. 31, de 4 de julho de 2011. Dispõe sobre a indicação de uso dos produtos saneantes na categoria “Esterilizante”, para aplicação sob a forma de imersão, a indicação de uso de produtos saneantes atualmente categorizados como “Desinfetante Hospitalar para Artigos Semicríticos” e dá outras providências. ANVISA, 2011.

ANVISA - Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde: medidas de prevenção de infecção relacionada à assistência à saúde. 2013; Brasília (DF).

ANVISA. Controle de Infecção em Serviços da Saúde. ANVISA, 2014. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/legis.htm>>

ANVISA. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar. In: Caderno C Métodos de Proteção Anti-infecciosa. Brasil, 2000. 84 p. Disponível <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf>>. Acesso em 02 dez. 2013.

ANVISA. Informe Técnico n. 4 de março de 2007. Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde: Fundamentos para a utilização.

ANVISA. Nota técnica informa sobre infecções causadas por micobactérias, Agência Nacional de Vigilância Sanitária online, publicado em 08 de agosto de 2008.

APECIH - 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.

ARCIOLA, C.R. Etiology of implant orthopedic infections: A survey on 1027 clinical isolates. *Int. J Artif Organs*. 2005; 28:1091-1100.

BAIO P.V.P., et al., Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108: 23-29.

BARON EJ, PETERSON LR, FINEGOLD SM. Methods for testing antimicrobial effectiveness in: Bailey and Scott`s diagnostic microbiology, 9th ed. stLouis- Mosby - year. book, ink.; 70: 168-193. 1994.

BAUER W., et al., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Americ. J. Clinic. Pat*. 1966; 45: 493-496.

BAUMGARTNER JN, COOPER SL. Influence of thrombus components in mediating *Staphylococcus aureus* adhesion to polyurethane surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1998; 40:660-70.

BEGUN J., et al. Staphylococcal Biofilm Exopolysaccharide Protects against *Caenorhabditis elegans* Immune Defenses. *PLoS Pathogens* 2007; 3:4:57.

- BELELA-ANACLETO A.S.C, et al., Higienização das mãos e a segurança do paciente: perspectiva de docentes e universitários. *Texto Contexto Enferm.* 2013 Out Dez 22(4):901-8. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v22n4/05.pdf>
- BELMARES J. *Corynebacterium endocarditis* species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infectious Diseases* - 2007; 2: 1-8.
- BELMARES, R., et al., Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *LWT F. Sci.Technol.* 2004; 37: 857-864.
- BELTRÁN-ARROYAVE C., DÍAZ-DÍAZ A., LOAIZA-DÍAZ N. Osteomielitis crónica por *Corynebacterium striatum* en una adolescente. *Rev Chil Infectol.* 2016; 33: 696-699.
- BERNARD K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:3152-8.
- BERNARD, K. Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology.* 2013; 63: 2146-2154.
- BETETA LOPEZ A., et al. Cystitis and haematuria due to *Corynebacterium striatum*. A case report and review. *Actas Urol Esp.* 2009; 33:909-12.
- BIALEK S, et al., Memb. Ef. and Influx Mod. both Multidrug Resist. And Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* Model. *Ant. agents and chemotherapy.* 2010; 4373-4378.
- BIBERSTEIN EL, ZEE YC. *Tratado de microbiologia veterinaria.* Zaragoza: Acriba. 1994; 157-161.
- BIOMÉRIEUX. Brochura técnica: Informações biológicas para programas de identificação. França; 2005 - Ref.; 41207.
- BITRAGUNTA, S. et al. Safety and immunogenicity of single dose of tetanus–diphtheria (Td) vaccine among non/partially immune children against diphtheria and/or tetanus. *Vaccine.* 2010; 28:5934-5938.
- BITTAR F., et al. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:1231- 6.
- BLOCK S.S. *Disinfection, sterilization, and preservation.* 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, Perox. comp. 1991; 167-81.
- BLOCK S.S. Peroxygen compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lipp. Wil. & Wil. 2001;185-204.
- BOLTIN D., et al., *Corynebacterium striatum* - a classic pathogen eluding diagnosis. *Eur J Intern Med.* 2009; 20: 49-52.

BONIFAIT L, GRIGNON L, GRENIER D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environm Microbiol.* 2008; 74: 4969-4972.

BONMARIN I. et al., Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine.* 2009; 27: 4196-4200.

BOSSHARD, P. P., et al., Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2004. 42:2065–2073.

BOU-CHACRA N.A., MITSUKO TO. Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2003; 39.

BOYCE, J. M. Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Infect. Control. Hosp. Epid.* 1990. 11: 42-639.

BRANDENBURG, A. H. A. et al., Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J. Clin. Microb.* 1996; 34: 2089–2094.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING- Br-CAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos-*Corynebacterium spp.* 2017.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Version Brazil: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2017.

BRIDIER A, DUBOIS-BRISSENET F, GREUB G, THOMAS V, BRIANDET R. Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:2648–2654.

BROWN, M. R. W.; GILBERT. P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J. Appl. bacteriol. Symp. Suppl.*; 74: 87S–97S-1993.

BROWN, M. R. W.; WILLIAMS, P. The influence of environment on envelope properties effecting survival of bacteria in infections. *Annu. Rev. Microbial.* 1985; 39: 527-556.

BRUN-BRUISSON, C.; et al., Estrutura de biofilme. *Bol. de Biotec.* 2005.

CACOPARDO B., et al. Surgical site infection by *Corynebacterium macginleyi* in a patient with neurofibromatosis type 1. *Case Rep Infect Dis.* 2013; 2013:970678.

CAMELLO T.C.F., et al., 2003. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol* 34: 39-44.

CAMPANILE F., et al. 2009. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg Infect Dis.* 1:75-78.

CARVALHO R.V., et al., Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients, *braz j infect dis* 2018;22(4):347–351.

CAZANAVE C., et al. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:1518-23.

CDC-Center of Diseases Control and Prevention. Guideline for Environmental Infection. 2003.

CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE (HICPAC). MMWR. [periódico na Internet]. 2003; [acesso 10 fev 2011]; 52(RR-10):1-48. Disponível em URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/enviro/guide.htm>.

CERI H., et al. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocid susceptibility testing. *Grow.in Biof.* 2001;337-385.

CHANDRAN, F.L., et al., Diphtheroids-important nosocomial pathogens. *J Clin Diagn Res.* 2016;10: 28-DC31.

CHEN, F.L., et al., *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012; 45:255-258.

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

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

COLLADA M., et al., A. Septic arthritis in a native knee due to *Corynebacterium striatum*. *Reumatol Clin.* 2017; 17:30033-5.

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

COSTERTON J.W., VEEH R, SHIRTLIFF M. The application of biofilm science to the study of and control of chronic bacterial infections. *J Clin Inv.* 2003;112: 1446-1477.

COSTERTON J. W. et al., Microbial biofilms. *Annual Rev. Microb.* 1995; 49: 711-745.

COSTERTON, J.; STEWART, P.; GREENBERG, E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-1322.

COSTERTON, J.W. Higiene na Indústria de Alimentos - Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. *An. Rev Microb.* 2009; 10: 01- 054.

CRABTREE, JH, GARCIA, N.A. *Corynebacterium striatum* peritoneal dialysis catheter exit site infection. *Clin Nephrol.* 2003; 60:270-274.

CREAGH, R.J.M., et al., Pneumonia caused by *Corynebacterium striatum* in a patient with AIDS. *Enferm.Infecc. Microbiol.Clin.* 2000; 18:297–298.

CROXATTO, A., G. PROD'HOM, AND GREUB G., Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 2012. 36(2): p. 380-407.

DAISUKE, U., et al., *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with a catheter-related blood stream infection. *Case Rep Infect Dis.* 2017.

DANIELS, C., D. SCHOORS, AND G. VAN CAMP. Native valve endocarditis with aorta-to-left atrial fistula due to *Corynebacterium amycolatum*. *Eur. J. Echocardiography.* 2003;4:68–70.

DARBY C, H.S.U. GHORI N J.W., FALKOW S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* 2002; 417:243–244.

DAS, S, et al., *Corynebacterium* spp. as causative agentes of microbial keratitis. *Br J Ophthalmol.*2016;100:939-943.

DAVIS, L.S. Shape matching using relaxation techniques. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence.* the mac. 1979;1: 60-72.

DAVISON W.M, PITTS B., STEWART P.S. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2010. 54:2920–2927. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01734-09>.

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

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

DICKINSON R.B., et al., Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogus with distinct surface properties. *J Biomed Mater Res.* 1997; 36:152-62.

DICKSON, M.M.W., et al., An Organizational Climate Regarding Ethics: The Outcome of Leader Values and the Practices that Reflect Them', *Lead. Quart.* 2001; 12: 197-214.

DIEZ-AGUILAR M., et al. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32:769-72.

DONATO V., et al., *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through downregulation of the insulin-like. Signalling pathway.2017;10:1038–4332.

DONELLI, G; VUOTTO, C. Biofilm-based infections in long-term care facilities. *Future Microbiol.* 2014; 9:175-188.

DOOLEY D.P., et al., Validation of catheter semiquantitative culture technique for non-staphylococcal organisms. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 409-412.

DOOLEY, M.P.; FERNANDEZ-ARIAS, E.; KLETZER, K. Is the debt crisis history? Diagnosis of Central Venous Cateter-Related Sepsis: Critical Level of Quantitative Tip Cultures, *Arch. Intern. Med.* 1996;147: 873-877.

DUARTE, R.S.; et al., Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microb.* 2009; 47: 2149-55.

DUNOWSKA, M., MORLEY, P.S., HYATT, D.R. The effect of Virkon R S fogging on survival of *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* on surfaces in a veterinary - teaching hospital. *Vet. Microbiol.* 2005;105: 281-289.

EDWIN TAMASHIRO et al. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis: what does this concept change in therapeutical approach? eficacia biodescontaminante obtenida mediante la aplicación de virkon®, perasafe® e hidróxido sódico sobre superficies de alto riesgo microbiológico, *Rev. Comp. de Cien.Veter.* 2011; 5: 132-144.

EGUCHI, H., et al., High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:527-532.

EHRlich G.D., et al., Engineering Approach for the Detection and control of Biofilm Orthopedic Infections. *Clin Orthop Rel Res.* 2005; 437:59-66.

ELASRI, M. O.; MILLER, R.V. Study of the response of the biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. and Environ. Microb.* 1999; 65: 2025-2031.

EL-KHOLY A., et al., Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units at Cairo university hospitals: first step toward initiating surveillance programs in a resource limited country. *Am J Infect Control.* 2012 Ago; 40(6):216-20.

EMMANUEL, E., et al., Fate of GA in hospital wastewater and combined effects of GA and surfactants on aquatic organisms. *Environ Int.* 2005;31(3):399-406.

ENI, S et al., Demetallization of *Enterococcus faecalis* biofilm: a preliminary study. *J Appl Oral Sci.* 2018;26.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN).;1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 12 dez. 2013.

FALKINHAM, J. O. *Mycobacteria laerosols* and respiratory disease. *Emerg. Infect.* 2003;763-767.

FAVERO, M. S. Sterilization Procedures Accomplished by liquid chemical Germicides, Chemical Germicides in the Health Care Field-Current and Evaluation of Efficacy and Reserche Needs. *Amer. Soc. for Microb.* 1987; 652-674.

FAVERO, M. S.; BOND, W. W. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Block, S. S. *Disinfection, sterilization and preservation*, 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger. 1991; 617-641-

FERGUSON, B. J.; STOLZ D. B. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol.* 2005;19: 452-7.

FERNANDES A.T. RIBEIRO N. F., *Infecção do Acesso Vascular, em Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde.* São Paulo (SP): Atheneu. 2000; 556-79.

FERNANDEZ GUERRERO M.L., et al., *Corynebacterium striatum: an emerging nosocomial drug resistant endocardial pathogen.* *J Heart Valve Dis.* 2013; 22:428-30.

FERNÁNDEZ GUERRERO, M.L., et al., *Multidrug-resistant Corynebacterium successfully treated with daptomycin.* *Int J Antimicrob Agents.* 2012. 40:373-4.

FERNÁNDEZ-AYALA M, NAN DN, FARIÑAS MC. *Osteomyelitis due to Corynebacterium striatum.* *Am J Med.* 2001; 111: 167.

FERNÁNDEZ-NATAL I., et al., *Phenotypic, molecular characterization, antimicrobial susceptibility and draft genome sequence of Corynebacterium argentoratense strains isolated from clinical samples.* *New Microbes New Infect.* 2016; 10:116-21.

FONTANA, R.T. *As micobacterias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública.* *Rev. Bras. Enferm.* 2008; 61: 371-376.

FOSTER H., SMALL D., FOX G. *The mouse in biomedical research.* New York: Academic Press, 1983. 272.

FRANCO M.G. *Animais de laboratório - o camundongo.* Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/animais.htm>. [14 out 2006].

FRANSON, T. R., et al., *Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular Cateters.* *J Clin Microb.* 1984; 20: 500-505.

FUNKE, G., BERNARD, KA. *CORYNEFORM Manual of Clinical Microbiology.* USA:ASM Press; 2011. p. 413-442.

FUNKE, G., BERNARD, K. A. *Coryneform gram-positive rods.* In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. *Manual of clinical microbiology.* 9th ed. Washington, DC: ASM Press.; 2007.

FUNKE, G., PÜNTER, V., VON GRAEVENITZ, A. *Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria.* *Agents Chem.Dec.* 1996; 40: 2874-8.

FUNKE, G. et al., *Clinical microbiology of coryneform bacteria.* *Clin. Microb.* 1997;10: 125-59.

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

GARCÍA-CRESPO, D.; et al., *Technical note: molecular typing of Corynebacteriumbovis isolates by pulsed-field gel electrophoresis.* *J Dairy Sci.* Wayne, PA: Clin. and Lab. Stand. Inst. 2005; 88: 1705-1707.

GARCIA-CRESPO, D., et al., A. Polymorphisms in Basque sheep breeds determined by PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR. *Vet. Rec.* 2004; 154: 717-722-.

GARSIN D.A., et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;10892–10897.

GILBERT, P., BROWN, M. R. W. Some perspectives on preservation and disinfection in the present day. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1995; 36: 219-226.

GILI N.J. et al., Preoperative preparation of eye with chlorhexidine solution significantly reduces bacterial load prior to 23-gauge vitrectomy in Swedish health care. *BMC Ophthalmology.* 2018; (18):167.

GNANADHAS D.P., MARATHE S.A., CHAKRAVORTTY D. Biocides resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Invest Drugs.* 2013;22: 191–206.

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

GOMES D.L. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 754-760.

GOMILA, M., et al. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. *BMC Microbiol.* 2012; 4:1-8.

GROBE, K.J., STEWART, P.S. Characterization of GA efficacy against bacterial biofilm. *Corrosion.* 2000;124:1-11.

GUVERICH, I. The Disinfectant Dilemma Revisited. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 1990.; 11: 96-100.

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

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

HAMANN, T. Infecções da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva, *Rev. Latino-am Enf.* 2007; 15: 3.

HASCOET, S., et al. Infective endocarditis risk after percutaneous pulmonary valve implantation with the melody and sapien valves. *JACC Cardiovasc Interv.* 2017;10:510-517.

HASHIZUME ET A.L. Native Valve Endocarditis due to *Corynebacterium striatum* confirmed by 16S Ribosomal RNA Sequencing. *Infect Chemother .* 2016; 48(3): 239–245.

HAWKEY, P.M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *B. M. J.*; 1988. 317: 657-660.

HEDRICK T.L., ADAMS J.D., SAWYER R.G. Implant-Associated Infections: An Overview. *J Long-Term Eff ects Med Implants*. 2006;16(1):83-99.

HEIDEMANN, D.G.; et al., *Corynebacterium striatum* keratitis. *Cornea*. 1991; 10: 81-82.

HERMANN M, VADAUX PE, PITTIT D. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as a mediator of adherence of clinical staphylococci isolates to foreing material. *J Infect Dis*. 1995; 188; 158:693-701.

HINNEBUSCH BJ, PERRY RD, SCHWAN TG. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. *Science* 1996; 273:367–370.

HINNEBUSCH B.J., et al., Forsberg A Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* 2002; 296:733–735.

HIRATA, R. JR., et al., Potential pathogenic role of aggregative adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J. Med. Biol. Res*. 2008; 41: 986–991-.

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

HODGKIN J., et al., Two *Leucobacter* strains exert complementary virulence on *Caenorhabditis* including death by worm-star formation. *Curr Biol*. 2013; 2157–2161.

HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Sciences, India*. 2011; v. 3, n. 3, p. 55-65, Abril.

HONG, J.S., et al. Chronic treatment with haloperidol accelerates the biosynthesis of enkephalins in rat striatum. *Brain Research*. 1979:192-195.

HOWIE, R.; ALFA, M. J.; COOMBS, K. Survive of enveloped and non-enveloped viroses on surfaces comparedo with other micro-organisms and impact suboptimal disinfectant exposure. *J. Hosp. Infec*. 2008; 69: 368-376.

HOYLE B., COSTERTON J. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res*. 1991; 37: 91-105-.

IARIA C., et al. Outbreak of multi-resistant *Corynebacterium striatum* infection in an Italian general intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2007; 67:102-4.

ISHIWADA, N., et al. Clinical and bacteriological analyses of bacteremia due to *Corynebacterium striatum*. *J Infect Chemother*. 2016; 22:12:790-793.

IWALOKUN, B.A., et al., Bacteriologic and plasmid analysis of etiologic agents of conjunctivitis in Lagos, Nigeria. *J Ophthal Inflamm Infect*.2011;1:95-103.

JANDA, W. M. *Corynebacterium* species and the Coryneform Bacteria: Part I: New and Emerging Species in the Genus *Corynebacterium*. Clin. Microb. Newles, USA.; 20: 41-52-1998.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. J. Bact. 1990; 172: 1418-1423.

JOHN, N., et al. Bactericidal, Virucidal, and Mycobactericidal Activities of Reused Alkaline Glutaraldehyde in an Endoscopy Unit, Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31(11):2988-95.

JOSHUA G.W., et al., *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. Microbiology. 2003; 149:3221–3229.

KAMPF G., et al. Resistance or adaptation? How susceptible is a 'glutaraldehyde-resistant' *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the absence of selection pressure? J Hosp Infect. 2013; 84:316–318.

KATSIKOIANNI M., MISSIRLIS Y.F. Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and Techniques used in Estimating Bacteria - Material Interactions. Eur Cells Mat. 2004; 8:37AM-57.

KHAN, N. et al. Resurgence of diphtheria in the vaccination era. Indian J. Med. Microbiol. 2007, v. 25, p. 434.

KIMURA, S., et al. Clinical characteristics and predictive factors for mortality in coryneform bacteria bloodstream infection in hematological patients. J Infect Chemoter. 2017; 23:3:148-153.

KIRSCHKE D.L., et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* contamination associated with a manufacturing defect in bronchoscopes. N Engl J Med. 2003; 348:214–220.

KNOX, L. K., AND A. H. HOLMES. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8:97–99.

KONEMAN, E. W.; et al., *Corynebacterium striatum*: an underappreciated community and nosocomial pathogen. J Infect. 2005; 50: 338-343.

KWASZEWSKA A.K., BREWCZYŃSKA A., SZEWCZYK E.M. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. Pol J Microbiol .2006; 55: 189-193.

LEE H.W., et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin Microbiol Infect .2008; 14: 49-54.

LEGGET, B.A. Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from a wound in a horse. Vet. Rec., v. 166, v. 21, p. 656-657, 2010.

LEHMANN and NEUMANN. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik, 1st ed., J.F. Lehmann, München, 1896 - 1907.

LEMBKE C, et al. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environm Microbiol.* 2006; 72: 2864-2875.

LEONARD, R. B. et al. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32, 164-169.

LETEK M., et al. Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential *divIVA* gene as a target. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 265(2):256-63.

LEUNG M.C., et al., *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci.* 2008 Nov;106(1):5-28.

LEWIS, D. L.; ARENS, M. Resistance of microorganisms to disinfection in dental and medical devices. *Nat. Med.* 1995; 1: 956-958.

LÓPEZ, A. B. et al. Cystitis and haematuria due to *Corynebacterium striatum*. A case report and review. *Actas.Urol. Esp.* 2009; 33: 909-912.

LORENA N.S.O., DUARTE RS, PITOMBO MB. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos: a hipótese do glutaraldeído. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2009;36(3):266-7. 11.

LORENA N.S.O., et al. *Mycobacterium massiliense* clone BRA100 associado a infecções pós-cirúrgicas: resistência a altas concentrações de glutaraldeído e produtos alternativos para desinfecção de alto nível. *Acta cir. bras.* 2010;25(5):455-9.

MAGIORAKOS, A.P., et al. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:268-281.

MAKI, D. G., WEISE, C. E., SARAFIN, H. W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-Cateter-related infection. *The New Engl. J. Med.* 1977; 296: 1305-9.

MALINI S., et al., *Corynebacterium striatum*: an emerging respiratory pathogen, *J Infect Dev Ctries.* 2018; 12(7):581-586.

MAN, P. et al. Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen/deuterium exchange measurements. *FEBS J.* 2010; v. 277, p. 653-666.

MARTIN, H., et al. Comparison of the virucidal efficiency of peracetic acid, potassium monopersulfate and sodium hypochlorite on hepatitis A and enteric cytopathogenic bovine orphan virus. *The Society for Applied Microbiology.* 2013; 115:955-968.

MARTIN, M. C., et al., Septicemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. *J. Med. Microb.;* 52: 599-602-2003.

MARTINEZ-MARTINEZ L., et al. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2458-2461.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; ORTEGA, M. C.; AND SUAREZ, A. I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J. Clin.Microbiol.* 1995; 33: 1318-1321.

MARTINS C.A.S., et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104: 905-913.

MARTINS, C.A.S. et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:905-913.

MASEDA H., et al. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.*2009.

MASSUDA, H., MASAI, T., TAKATANI, M., KATO, H. 2018. A life-threatening infection due to *Corynebacterium striatum*: a lesson learned. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 4:709-710.

MATSUOKA, T., et al. Evaluation of efficacy and clinical utility of potassium peroxymonosulfate-based disinfectants. *Canadian Journal of Infection Control.* 2017; 32(2):93-97.

MATTOS-GUARALDI A.L., et al., *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev. de Microb. Argentina.* 2001; 33 :96-100.

MATTOS-GUARALDI A.L. et al. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. *FEMS Microbiol Lett* 170. 1999;159-166.

MATTOS-GUARALDI A.L., FORMIGA LC. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Braz J Med Biol Res* 24.1991; 399-406.

MATTOS-GUARALDI A.L., FORMIGA L.C., ANDRADE A.F.B. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol.* 1999; 38: 37-42.

MATTOS-GUARALDI A.L., et al., Draft Genome Sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09 a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the Urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient.; *Genome Announc.* 2015; 00869-15.

MATTOS-GUARALDI, A. L. et al. Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. *J. Med. Microbiol.* 2011, v. 60, p.1685-1688.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr.Microb.* 1998; 137: 156-158.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA JR, R.; DAMASCO, P. V. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos sobre o cenário atual. *Rev. Ass. Bras. Imun.* 2011; v. 1, p.1-19.

MATTOS-GUARALDI, A.L., HIRATA JR, R., AZEVEDO, V.A. *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* - General Aspects, 2014;

MAY, M. L. A., MCDOUGALL, R. J., ROBSON, J. M. *Corynebacterium diphtheria* and the returned tropical traveler. *J. Travel Med.* 2014, v. 21, p. 39-44.

MCDONNELL, G. E., RUSSELL, A. D. Antisepsis and Disinfection: Action, and Resistance. *Clin. Microbiol Rev.* 1999; 12: 147-179.

MCDONNELL, G. E., WASHINGTON D. C. Antisepsis, Disinfection, e Sterilization: Typo, Action, and Resistance. A. S. M. Press.; 2007.

MCDONNELL G. E., et al., GUIDELINE FOR PREVENTION OF SURGICAL SITE INFECTION, By Alicia J. Mangram, Teresa C. Horan, Michele L. Pearson, Leah C. Silver, and William R. Jarvis. CDC, Apr. 1999.

MCELVANIA T.E., et al. Rapid emergence of daptomycin resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* a cautionary tale. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33:2199-2205.

MCGEE, D. C., GOULD, M. K. Preventing complications of central venous Cateterization. *N. Engl. J. Med.*; 348: 1123-33-2003.

MCNAMARA, P. J.; CUEVAS, W. A.; SONGER, J.G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene.* 1995; v. 14, n. 156, p. 113-118.

MELLO, D.R., et. Al. 2007. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços. Nota 04/2007 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

MENDES F.S., GONÇALVES V. M. S. Lavagem das mãos no controle da infecção hospitalar: um estudo sobre a execução da técnica, *Rev.Enf. Integ.* – Ipatinga: Unileste-MG. 2009; 2: 8.1.

MIURA F.K, et al. Cerebrospinal fluid shunt infection caused by *Corynebacterium* sp: case report and review. *Brain Inj.* 2014; 28:1223-5.

MOHAMED, E. O., MILLER, R. O. Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. *Microbiol.* 1999; 65: 2025-2031.

- MOLLMANN S, et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium imitans* DSM 44264, isolated from a five-month-old boy with suspected pharyngeal diphtheria. *Genome Announc.* 2014.
- MOORE, K., et al., Surface bacteriology of venous leg ulcers and healing outcome. *J. Clin. Pathol.* 2010; 63: 830-834.
- MORAES, M. S. V.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; PASSOS, F. J. V.; GOMIDE, L.A.M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. *Ciênc. Tecnol. aliment.* 1997; 17.
- MORAES, M.N. et al. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais, *Revista de Medicina de Minas Gerais*, v. 23, n. 3, p. 99-10, Belo Horizonte, jan. 2013.
- MOREIRA, L. O., et al. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl. Env. Microb.* 2003; 69: 5907–5913.
- MORENTE, E.O., et al. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 2013; 162:13–25.
- MOSESSON M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:1894-1904.
- MOSSER T., MATIC I., and LEROY M. Bacterium-Induced Internal Egg Hatching Frequency Is Predictive of Life Span in *Caenorhabditis elegans* Populations. *Applied and Environmental Microbiology.* 2011; 8189–8192.
- MOYAD T.F. Two-stage arthroplasty for the treatment of chronic osteomyelitis after routine arthroscopic knee surgery. *Orthopedics.* 2013; 36:109-12.
- NAVAS, J, et al. Susceptibility to aminoglycosides and distribution of aph and aac (3)-XI genes among *Corynebacterium striatum* clinical isolates. *PLoS One.* 2016; 11:12.
- NEEMUCHWALA A, et al. In Vitro Antibiotic Susceptibility Pattern of Non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(4):01776–17.
- NIH: National Institutes of Health [Internet]. 2002. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>.
- O'NEILL E., et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol.* 2008; 190: 3835-3850.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microb.* 2000; 154: 49-79.
- OJHA, A., HATFULL, G.F. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelinsiderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Mol Microbiol.* 2007; 66(2):468–483.

OLENDER A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy*. 2013; 59:294–306.

OLENDER, A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy*. 2013; 59:294-306.

OLIVA, A. et al., Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. 2010.

OLIVEIRA, A. C. Healthcare-associated infection: challenges in its prevention and control. *Rev. Min. de Enf., Brazil*. 2009; 13, 3: 445-450-.

OLSON ME, CERI H, MORCK DW, BURET AG, READ RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002; 66: 86-92.

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

OMS. Organização Mundial da Saúde. Immunization, vaccines and biologicals: recommended surveillance standard of diphtheria.

ORTÍZ-PÉREZ, A., et al., High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb. Drug. Resis.* 2010; 16:273-277.

OSBALDISTON, G.W. Laboratory procedures in clinical veterinary bacteriology. Baltimore: Univ. P. Press. 1973; 265.

OTSUKA Y., et al. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54: 109-114.

OTTER, H. Health: Challenging a pet hypothesis, *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2015; 291-294.

PADOVEZE M.C. & FORTALEZA C.M.C.B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. *Rev Saúde Pública* 2014; 48(6):995-1001

PAREDES, J., et al. Smart central venous port for early detection of bacterial biofilm related infections. *Biomed Microdevices*. 2014; 16:365-374.

PARFENTJEV I. A. and CATELLI, A. R. Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *Journal of bacteriology*. 1964; 88(1):1–3.

PASCUAL, A., et al. Update on pathogenesis and diagnosis of intravascular catheter-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29:16-21.

PELOSO P.F.D. et al Laboratório Richet, Rio de Janeiro, Brasil. Identificação Direta de Patógenos em Hemoculturas por MALDI-TOF *J Infect Control* 2013; 2(2):128-129.

PEREIRA, M. S. Infecção hospitalar e seu controle: problemática e o papel do enfermeiro. *Rev. Esc. Enf. da USP, Brasil*. 1993; 27: 355-361.

PITOMBO M.B. LUPI O., DUARTE R.S. Infections by rapidly growing mycobacteria resistant to disinfectants: a national matter? *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009; 31(11):529-33.

POOJARY, I. et al., *Corynebacterium* species causing breast abscesses among patients attending a tertiary care hospital in Chennai, South India. *Infect Dis (Lond)* 2017; 6:1-4.

POOLE K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2002; 92:55S-64S.

QIN, L., et al. Characteristics of Multidrug-Resistant *Corynebacterium* spp. Isolated from Blood Cultures of Hospitalized Patients in Japan, *Jpn. J. Infect. Dis*. 2017; 70, 152-157,.

QUEIROZ N. S. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto contexto - Enferm. spe, Florianópolis*. 2004; 13.

QUINN, B., BAKER, D. Using oral care to prevent nonventilator hospital-acquired pneumonia. *Am Nurse Today*. 2015; 10:18-23.

RAO R.S., et al., Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26: 333-337.

RATTI, R.P., et al., Elongated cells of *Listeria monocytogenes* in biofilms in the presence of sucrose and bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* All. *Food Science and Technology*. 2010; 30:1011-1016.

REECE R.M., CUNHA C.B., RICH J.D. *Corynebacterium minutissimum* vascular graft infection: case report and review of 281 cases of prosthetic device-related *Corynebacterium* infection. *Scand J Infect Dis*. 2014; 46:609-16.

RENOM F., et al. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2064-2067.

RENOM, F., et al. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New Microbes New Infect*. 2014; 2:106-114.

REVELL P.A., MILLER V.L. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 205: 159-164.

REY, J., et al. Endoscope disinfection a resource-sensitive approach. *World Gastroenterology organization*. 2011.

RIBEIRO, M.M. Avaliação da efetividade de reprocessamento de endoscópio gastrointestinal flexível. *Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Enfermagem - UFMG*. 2011.

RICE S.A., et al., The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J.* 2009; 3: 271-282.

RIEGEL, J. A.; MADDRELL, S. H. P., FARNDALE, R. W.; CALDWELL, F. M. Stimulation of fluid secretion of Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* Meig. by cyclic nucleotides of inosine, cytidine, thymidine and uridine. *J. Exp. Biol.* 1998; 201: 3411–3418.

RIGDON R.H. Hemolysis associated with plastics - A histopathologic study with polyurethane. *J Biomed Mater Res* 1970; 4: 57-71.

ROHDE H., et al. Staphylococcal Biofilm Exopolysaccharide Protects against *Caenorhabditis elegans* Immune Defenses. *PLoS Pathogens.* 2007; 3:4:57.

ROSENTHAL V. D., et al., The attributable cost, length of hospital stays, and mortality of central line-associated Sanguestream infection in intensive care departments in Argentina: A prospective, matched analysis. *Am. J. Infect Control.* 2003; 31: 475-80-.

ROSSELLÓ-MORA, R. DNA–DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes.* 2005; pp. 23–50.

RUFAEL D.W., COHN S.E. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1994; 19: 1054-1061.

RUSSELL A.D., RUSSELL N.J. Biocides: activity, action and resistance. *Symp Soc Gen Microbiol.* 1995; 53: 327-365.

RUSSELL, A. D., HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* 1994; 31: 351-371.

RUSSELL, A.D., CHOPRA, I. In *Understanding antibacterial action and resistance*, 1st ed. Ell. Hor, London.; 1990.

RUTALA WA, WEBER DJ, Advisory Committee (HICPAC). *Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities*, 2008, Centers for Disease control and Prevention, Atlanta, 2008;158 pp.

RUTALA, W. A. APIC guidelines for selection and use of disinfectants. *Am. J. Infect. Control.* 1995; 23: 313-342.

RUTALA, W. A. et al., Inactivation of mycobacterium tuberculosis and *Mycobacterium bovis* by 14 hospital disinfectants. *Am. J. Med.* 1991; 91: 267S-271S.

RUTALA, W. A; WEBER, D. J. National Nosocomial Infections Surveillance (NNISS) System report, data summary from January, Centers for Disease Control and Prevention, hybe. *Am J Infect Control.* 2004; 32: 470-85.

RZHEPISHEVSKA O., et al. The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture. *Biomater Sci* 1. 2013; 589-602.

SABBADINI PS, et al. Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 706-711.

SANCHEZ P, MORENO E, MARTINEZ JL.. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:781–782.

SANTIAGO, L. B. et al., Avaliação in vitro da sensibilidade da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento, *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo. 2008; 77, 4: 593-600.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado de Saúde. Resolução SS - 27, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova norma técnica que institui medidas de controle sobre o uso do Glutaraldeído nos Estabelecimentos Assistenciais de Saúde. São Paulo, 2007.

SAORI, M. C. et al., Efeito antimicrobiano In Vitro da Associação de Polimixina B e Ceftazidima Em Amostras Clínicas De *Pseudomonas Aeruginosa*. *Cienc. Cuid. Saud*. 2008; 7: 76-81.

SARA M. Soto importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: *Advances in Biology New Therapeutic Approaches* Volume 2014, Article ID 543974.

SATTAR, S.A., SPRINGTHORPE, V.S. New methods for efficacy testing of disinfectants and antiseptics. In Rutala WA, ed. *Disinfection, sterilization and practices in healthcare facilities*. Washington. D.C: Assoc. for Prof. in Infec. Cont. and Epid. 2001; 174: 80-86.

SAVINI, V., GHERARDI, G., FAVARO, M., et al., About a bloodstream *Corynebacterium striatum* isolate. *Journal of the Institute of Microbiology*. 2013; 58(6):451-3.

SCHOLLE DA 2007. Spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum*. *J Clin Microbiol* 45: 656-658.

SCHRODER J., MAUS I., MEYER K., et al. Complete genome sequence, lifestyle, and multidrug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*. 2012; 13:141.

SEKAR, S. K. R. et al. Strengthening the laboratory diagnosis of pathogenic *Corynebacterium* species in the Vaccine era. *Letters in Applied Microbiology*. 2017; v. 65, p. 354-365,.

SEVERO C.B. et al. Multiple pulmonary nodules caused by *Corynebacterium striatum* in an immunocompetent patient. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014; 56:89-91.

SHADID M.B. et al., Chlorhexidine 0.5%/70% Alcohol and Iodine 1%/70% Alcohol Both Reduce Bacterial Load in Clean Foot Surgery: A

Randomized, Controlled Trial. *The Journal of Foot & Ankle Surgery*. 2019; 58: 278–281.

SHAH, M, MURILLO, JL. Successful treatment of *Corynebacterium striatum* endocarditis with daptomycin plus rifampin. *Ann Pharmacother*. 2005; 39:1741-1744.

SHI, K., et al., Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3:1-22.

SHI, X., ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. T. in *F. Scien. Tech.*; 2006.

SIERRA, J.M., et al., Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49:1714-1719.

SIFRI C.D., et al., *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun*. 2003; 71:2208–2217.

SIMÕES L.C., et al., The effects of glutaraldehyde on the control of single and dual biofilms of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. *Biofouling* 2011; 27:337–346.

SIMÕES M, et al., Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006; 33:741–749.

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. andTech*. 2003; 47, 5: 217-223.

SMITH K, HUNTER IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2008; 57:966– 973.

SOARES, M. A. Resistência Antibiótica. *Pharm. Bras., Brasil.*; 59-62-2001.

SORIANO F. et al., In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63: 353-356.

SORIANO F., PONTE C., GALIANO M.J. Adherence of *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2) and *Corynebacterium jeikeium* to intravascular and urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 453-456.

SOUZA C., et al., Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110:242-248.

SOUZA E S, et al., MORTALIDADE E RISCOS ASSOCIADOS A INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE - EUCAST-BRCAS. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST.

SOUZA, A. C. S., PEREIRA, M. S., RODRIGUES, M. A. V. Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. *Rev.latino-am.enf. Rib.Preto, Brasil.*; 6, 3: 95-105-1998.

SOUZA, A.C.S., PEREIRA, M.S., RODRIGUES, M.A.V. Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. *Rev Latino-Am Enf.*1998; 6:95-105.

STEPANOVIC S, et al., A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microb Meth* 2000; 40: 175-179.

STEPHAN, J. MULTIDRUG RESISTANCE OF A PORIN DELETION Mutant of *Mycobacterium, smegmatis*. *Antimicrob. Agent. Chem.*; 48, 11: 416-370-2004.

STEWART P.S., COSTERTON JW 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.

SUPERTI, S.V., MARTINS, DS, CAIERÃO, J, et al., *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2009; 51:115-116.

SUZUKI, T. et al., Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microb.* 2007; 45: 3833-3836-.

SVETLÍKOVÁ, Z., et al., Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(9):4015-8.

TARR P.E., et al., 2003. Multidrug resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transplant Infect Dis* 5: 53-58.

TAUCH, A, et al. The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *Journal of Biotechnology* 2008; 136:11-21.

TEGOULIA VA, COOPER SL. *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Col Surf B: Biointerf.* 2002; 24:217-28.

TENOVER, FC, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2233-2239.

THEEL E.S. et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2002; 50: 3093–3095.

THOMPSON, et al., The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:4876-4882.

THOMSON, Jr. R. B. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In: PR Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, MA Pfaller, Manual of clinical microbiology, ASM Press, Washington D.C.; 485-514-2007.

TON-THAT H., et al., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis. *J Biol Chem.* 2001; 277(9):7447-52.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed.; 2005.

TOTÉ, K., et al., 2010. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 76(10):3135-42.

TRENTI D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO A.J.; *Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate*. Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p.24, set, 2013

TSCHUDIN-SUTTER S., et al., 2011. Emergence of glutaraldehyde-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32:1173–1178. <http://dx.doi.org/10.1086/662624>. 19.

VAN ACKER H., VAN DIJCK P., COENYE T. 2014. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol* 22:326–333.

VARGAS S. S., et al., *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.*; 51: 115–6-2009.

VAUDAUX PE, et al., Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. *Infect Immunol.* 1984; 45:768-74.

VERMA, R, KRAVITZ, G. *Corynebacterium striatum* empyema and osteomyelitis in a patient with advanced rheumatoid arthritis. *BMJ Case Reports* 2016; doi:10.1136/bcr-2016-214691.
VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. D. *Bacteriologia Geral*. In: Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Brasil.; 2007.

VERROKEN A, et al. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(1): 44-50

VIKRAM, A., BOMBERGER, J., KYLE, J. B. 2015. Eflux a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas Fluorescens* end *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(6):3433-40.

VON GRAEVENITZ, A.; Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures. *Infect. Switzerland.*; 26, 1: 36-38-1998.

VU, T.; ALTMAN, A.; SHOHAM, Y. On the complexity of schedule control problems for knockout tournaments. In *Proc. of AAMAS.*; 225–232-2009.

WAGNER, K. S. et al. Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiol. Infect.*, v. 138, p. 1519-1530, 2010.

WANG, C. C.; MATTSON, D.; WALD, A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman Catheters. *Bone Marrow Transplant.*; 27: 445-449-2001.

WANG, J, et al.[Drug susceptibility and homologous analysis on *Corynebacterium striatum* strains isolated from inpatients]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2014; 94:2501-2505.

WANG, J, et al. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China. *J Infect Dev Ctries.* 2016; 10:12:1299-1305.

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

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview – Biofilm, city of microbes. *J. of Bacter.* 1999; 182: 2675-2679-

WEBB, S. J., et al., G. Further evidence for an abnormality in the temporal processing of faces in autism. Poster session presented at the Society for Research in Child Development, Tampa, FL.; 2003.

WEISS K, LABBÉ AC, LAVERDIÈRE M. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clin Infect. Dis* 1996;23: 1246-1248.

WERTH, B.J., et al., Emergence of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum* in two patients with left ventricular assist device infections. *Microb Drug Resist.* 2016; 22:233–7.

WILLIAM O. et al., Multidrug-Resistant *Corynebacterium striatum* Associated with Increased Use of Parenteral Antimicrobial Drugs, *Emerging Infectious Diseases*.2016, 22-11.

WONG, K. Y.; CHAN, Y. C.; WONG, C. Y. *Corynebacterium striatum* as an emerging pathogen, *J. Hosp. Infect.* 2010; 76: 371-372.

WU LY, et al. A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Talanta.* 2013; 106:360–366.

YANAI, M, et al., Retrospective evaluation of the clinical characteristics associated with *Corynebacterium* species bacteremia. *Braz J Infect Dis.* 2018; 22:1:24-29.

YOO G, et al., Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* bacteremia: first case in Korea. *Ann LabMed*. 2015; 35:472–3.

ZHANG S, et al. Comparative signature-tagged mutagenesis identifies *Pseudomonas* factors conferring resistance to the pulmonary collectin SP-A. *Plos Pathogy* 2005;1:259–268.

APÊNDICE A - Contribuição acadêmica durante período do doutorado

Contribuição acadêmica

Colaboração no capítulo 18 do livro *As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade*.



CAPÍTULO 14	131
DIVERSIDADE DE INVERTEBRADOS DO SOLO EM DIFERENTES SISTEMAS EDÁFICOS NA FLORA DE CANELA, CANELA (RE)	
Rozemeri Lazzari Lacerda Joara Vendório	
DOI 10.22533/At.ed.18019280314	
CAPÍTULO 15	140
EFICIÊNCIA DO PROCESSO ANAMMOX NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO EM REATOR DE LEITO BUBLENDO	
Jéssica Rosa Dias Fabrícia Goldschmidt Antes Angélica Chiri Marina Cetani De Pa Ismael Chimanko Jacinto Ailton Kurz	
DOI 10.22533/At.ed.18019280315	
CAPÍTULO 16	144
ENSINO DE BIOLOGIA ANIMAL PELO EDUTREINAMENTO: A PRODUÇÃO DO PROGRAMA "RADIO ANIMAL" E SUA UTILIZAÇÃO NA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA	
Waldiney Melo	
DOI 10.22533/At.ed.18019280316	
CAPÍTULO 17	154
ENSINO DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL E SAÚDE: A IMPORTÂNCIA DA TRANSVERSALIDADE PARA OS GRADUANDOS DE SAÚDE	
Mércia Regina Terra Rafaela Clerta da Silva Elisa Barbosa Leite da Faria Estevão Dayanna Cosko Martins Matias da Silva Fernanda Giselli Quintana Ednávia de Oliveira Miranda Guiz	
DOI 10.22533/At.ed.18019280317	
CAPÍTULO 18	164
ENTEROCOCCUS SP., ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO JOANA LOCALIZADO NA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO	
Valter Wellington Alves de Oliveira Barbara Araújo Figueira Bruna Ribeiro Sudo Karam Juliana Giordano Botelho Oliveira Paula Marcelle Azevedo Pereira Ribeiro Declia Maria Ferreira da Silva Cassius Souza Raphael Hirata Jr Ana Luiza de Mattos Bastardi	
DOI 10.22533/At.ed.18019280318	

APÊNDICE B - Participação em eventos internacionais

Participação em eventos internacionais

Yuri Faria, Felipe Oliveira Cabral, Higor Franceschi Mota, Guilherme G C Oliveira, Cecília Maria Ferreira Da Silva, Valmir W.A De Oliveira, Andrezza Do Espirito Santo Cucinelli, Lais M O Fernandes, Allan M L Pontes, Dryelle Rodrigues Oliveira, Rondinele Silva Santos, Cintia Silva Santos, Raphael Hirata Júnior, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Cassius Souza (2018) Effects of proteinase-k on biofilm of multidrugresistant *Corynebacterium striatum* strains - XXIV Congresso Latino-americano de Microbiologia – Santiago – Chile;

Cecilia Maria Ferreira Da Silva (autor), Yuri V Faria, Fellipe O Cabral, Letícia N M Gusmão, Guilherme G C, Oliveira, Higor F Mota, Julianna G Olivella, Andrezza E S Cucinelli, Sabrina Santos Colodette, Santoro Brunna Garcia, Cíntia S Santos, Raphael Hirata Junior, Cassius Souza, Ana Luiza Mattos-Guaraldi (2018) Aspectos epidemiológicos e microbiológicos de amostras multi-resistentes de *Corynebacterium spp.* isoladas de pacientes atendidos de unidade hospitalar localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro - XXIV Congresso Latino-americano de Microbiologia – Santiago – Chile;

Mattos Guaraldi Ana Luiza, Cabral Fellipe Oliveira, Farias Yuri Vieira, Cucinelli Andrezza Do Espirito Santo, Simpson-Louredo Liliane, Castro Canellas Maria E. Freire , Vieira Laís Priscila S, Sant'anna Lincoln Oliveira , Costa De Oliveira Rodrigo, Hirata Júnior Raphael, Souza Cassius (2018) *Corynebacterium striatum* virulence potential in *Caenorhabditis elegans nematodes* - XXIV - Congresso Latino-americano de Microbiologia – Santiago – Chile;

Fellipe De Oliveira Cabral, Guilherme Goulart C. Oliveira, Higor Franceschi Mota, Andrezza Do Espírito S Cucinelli, Elisabete Alves Cappelli, Yuri Vieira Faria, Julianna Giordano B Olivella, Igor Ferreira Silva, Dryelle Rodrigues Oliveira, Cíntia Silva Santos, Raphael Hirata Júnior, Cassius Souza, Ana Luíza Mattos Guaraldi (2018) Influência do ferro na produção de biofilme em superfícies abióticas por *Corynebacterium striatum* – XXIV - Congresso Latino-americano de Microbiologia – Santiago – Chile;

Cassius Souza, Fellipe Oliveira Cabral, Guilherme Goulart Cabral, Débora Marinho Teixeira Freire, Higor Franceschi Mota, Vieira Y Faria, Juliana Nunes Ramos, Monica Cristina Souza, Louisy Sanches Santos, Cíntia S Santos, Verônica V Vieira, Raphael Hirata Júnior, Lílian Oliveira Moreira, Ana Luiza Mattos - Guaraldi (2018) Tolerância a biocidas e outros aspectos fenotípicos e moleculares de fatores de virulência de células sésseis e planctônicas de *Corynebacterium striatum* - XXIV - Congresso Latino-americano de Microbiologia – Santiago – Chile;

Cassius Souza, Higor Franceschi Mota, Maurício Martins Juliana Nunes Ramos, Monica Cristina Souza, Cíntia S Santos, Verônica V Vieira, Raphael Hirata Júnior, Lílian Oliveira Moreira, Ana Luiza Mattos - Guaraldi (2014) Influência do desinfetante glutaraldeído e de matéria orgânica na produção de biofilme em superfícies abióticas de clones multirresistentes de *Corynebacterium striatum* - III Congresso Latino Americano de Resistência Bacteriana-Gramado-RS;

Cassius de Souza, Liliane Simpson Lourêdo, Debora Gomes, Lilian de Oliveira Moreira, Ana Luiza de Mattos (2014) Biofilm production and glutaraldehyde 2% tolerance by planktonic and sessile forms of *Corynebacterium striatum* **Revista Biofilms 6 International Conference on Microbial Biofilms 11 - 13 May 2014 Vienna, Austria.**

Lincoln de Oliveira Sant 'Anna; Monica Cristina de Souza; Louisy Sanches dos Santos; Cintia Silva dos Santos; Leonardo Paiva de Sousa; Juliana Nunes Ramos; Higor Franceschi Motta; Cassius de Souza (2014) *Corynebacterium spp.* Em Infecções do Trato Urinário: Aspectos Epidemiológicos e de Resistência a Antimicrobiano - **III Congresso Latino Americano de Resistência Bacteriana-Gramado-RS;**

APÊNDICE C - Participação em eventos nacionais

Participação em eventos nacionais

Apresentações orais:

Cassius de Souza, Higor Franceschi, Ana Luiza de Mattos – Guaraldi (2017) Análise multifatorial da produção de biofilme por *Corynebacterium striatum* isoladas em surto nosocomial, utilizando desenho experimental in vivo: camundongos e células humanas monocíticas u-937 - **VI Congresso Brasileiro de Prevenção e Tratamento de Feridas e X Congresso Iberolatinoamericano sobre Úlceras Y Heridas – SILAUHE. – Salvador BA;**

Cassius de Souza e Ana Luiza de Mattos (2018) Correlação entre resistência e tolerância a gentes biocidas frente à *Corynebacterium striatum* - **VII Congresso Brasileiro de Prevenção e Tratamento de Feridas – Rio de Janeiro;**

Cassius de Souza e Ana Luiza de Mattos – Guaraldi (2017) Níveis de produção de biofilme em substratos abióticos diversos e de tolerância aos antissépticos clorexidina e álcool de amostra de *Corynebacterium striatum* isolada de ferida cirúrgica - **VI Congresso Brasileiro de Prevenção e Tratamento de Feridas e X Congresso americano sobre Úlceras Y Heridas – SILAUHE – Salvador - BA;**

Apresentações com exposição de pôsteres:

Cassius Souza, Yuri Vieira Faria, Juliana Nunes Ramos, Cíntia S Santos, Raphael Hirata Júnior, Lílian Oliveira Moreira, , Ana Luiza Mattos - Guaraldi (2017) Detection of antimicrobial resistance genes in *Corynebacterium striatum* isolated from a nosocomial outbreak in rio de janeiro authors: **29 ° Congresso Brasileiro de Microbiologia – Foz do Iguaçu PR;**

Yuri Vieira Faria, Juliana Nunes Ramos, Cíntia S Santos, Raphael Hirata Júnior, Lílian Oliveira Moreira, Cassius Souza, Ana Luiza Mattos - Guaraldi (2017) Corynebacterium Striatum Mature Biofilm Formation On Abiotic Surfaces: Enhancement Of Pathogenicity, Invasive Potential And Dissemination Of Multidrugresistance Clones In Nosocomial Environments: **29 ° Congresso Brasileiro de Microbiologia – Foz do Iguaçu PR;**

Liliane Simpson Lourêdo, Cassius de Souza e Ana Luiza de Mattos (2018) Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium ulcerans* and influence of phospholipase d and diphtheria exotoxins: a comprehensive study in mice - **29° Brasileiro de Microbiologia – SBM – 2017- Foz do Iguaçu;**

Letícia Marone-Gusmão, Monica Cristina de Souza; Louisy Sanches dos Santos; Cintia Silva dos Santos; Higor Franceschi Motta; Ana Luíza de Matos-Guaraldi, Cassius de Souza (2017) Monitoring and analysis of persistence and microbiological detection of antimicrobial resistance genes in corynebacterium striatum isolated from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro (2010-2017) – **29 ° Congresso Brasileiro de Microbiologia – Foz do Iguaçu PR;**

Cassius Souza, Higor Franceschi Mota, Maurício Martins, Juliana Nunes Ramos, Monica Cristina Souza, Cíntia S Santos, Verônica V Vieira, Raphael Hirata Júnior, LÍlian Oliveira Moreira, Ana Luiza Mattos - Guaraldi (2015) Quantitative and structural analysis of biofilm produced by of multi-resistant corynebacterium striatum isolated from nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. **27 ° congresso Brasileiro de Microbiologia Florianópolis, SC;**

Cassius Souza, Higor Franceschi Mota, Maurício Martins Juliana Nunes Ramos, Yuri Vieira Faria, Cíntia S Santos, Raphael Hirata Júnior, LÍlian Oliveira Moreira, Ana Luiza Mattos - Guaraldi (2015) Analisis by Scanning Electron Microscopy of Biofilm Formation on abiotic substrates by *Corynebacterium striatum*" - **25° Congresso Brasileiro de Microscopia, em Armação dos Búzios, Rio de Janeiro – Brasil;**

APÊNDICE D - Coorientações e colaborações acadêmicasOrientações e colaborações acadêmicas:Coorientação

Aluno: Fellipe de Oliveira Cabral – Nível: Graduação – Monografia título: **Influência suplementação e ausência de Ferro no Biofilme de *Corynebacterium striatum*** – Concluído 2017;

Colaboração em Orientações

Aluna: Letícia Morone – Nível: Mestrado - Tese título: **Monitoramento retrospectivo e prospectivo de cepa de *Corynebacterium striatum* após surto epidêmico em Hospital no Rio de Janeiro** – Fase: Concluído 2017;

Aluno: Felipe de Oliveira Cabral, Mestrado – Tese título: **Caracterização de diversos agentes estressores sobre células planctônicas de *Corynebacterium striatum*** – Fase: em desenvolvimento;

Aluno: Yuri Vieira Faria: Doutorado – **Dissertação título: Estudo genotípico e fenotípico do biofilme formado por *Corynebacterium striatum*** - em desenvolvimento;

Aluno: Higor Franceschi Motta, Doutorado - Título: **Caracterização *in vivo e in vitro* de fatores de Virulência genotípico e fenotípico de Cepas de *Corynebacterium striatum***; em desenvolvimento;

Aluna: Cecília da Silva Ferreira, Nível: Doutorado - Título: **Monitoramento e análises de potenciais de virulência de Cepas de *Corynebacterium* spp. Isolados em Hospital Universitário localizado na região Metropolitana do Rio de Janeiro**, em desenvolvimento.