



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Lorraine Herdy Heggendorn

**Potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de
pacientes hospitalizados**

Rio de Janeiro

2022

Lorraine Herdy Heggendorrn

Potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de pacientes hospitalizados

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Coorientador: Prof. Dr. Helvécio Cardoso Côrrea Póvoa

Rio de Janeiro

2022

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

H463 Heggendorrn, Lorraine Herdy.
Potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de pacientes hospitalizados / Lorraine Herdy Heggendorrn – 2022.
92 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna
Coorientador: Prof. Dr. Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa

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

1. *Corynebacterium* spp. – Patogenicidade – Teses. 2. *Caenorhabditis elegans* – Teses. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos – Genética – Teses. 4. Infecção hospitalar. I. Sant'Anna, Louisy Sanches dos Santos. II. Póvoa, Helvécio Cardoso Corrêa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU: 579.873.2:615.015.8

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7143

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

Assinatura

Data

Lorraine Herdy Heggendorrn

Potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de pacientes hospitalizados

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

Aprovada em 28 de setembro de 2022.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Louisy Sanches Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa (Coorientador)
Universidade Federal Fluminense

Prof^ª. Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª. Dra Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dr. Luís Guilherme de Araújo Longo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Cassius de Souza
Fundação Educacional da Região dos Lagos

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

A Deus, por me conceder coragem para acreditar, fé para não desistir e amparo nos momentos de ansiedade. Aos meus pais, pela generosidade, incentivo e pelas inúmeras vezes que renunciaram aos seus próprios sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Ao meu esposo, pelo apoio incondicional, compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras, Prof^a Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna e Prof^a Ana Luiza de Mattos Guaraldi, agradeço pela confiança no meu trabalho, pelos momentos de paciência e compreensão e, acima de tudo, pela dedicação e auxílio nos momentos de dificuldade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Helvécio Cardoso Côrrea Póvoa, pelo incentivo e parceria, pela convivência gratificante e por todos os ensinamentos transmitidos durante minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior (*In Memoriam*), exemplo profissional que sempre fará parte da minha história.

Ao Dr. Lincoln de Oliveira Sant'Anna, pela generosidade e colaboração constante.

Ao Dr. Luís Guilherme de Araújo Longo, pela disponibilidade, apoio e parceria.

Da mesma forma, agradeço aos amigos Sara Wilis Cussuol Gomes, Denise Braga Schimidt e Andrew Farsura que compartilharam comigo alegrias, ansiedades e preocupações. Obrigada pelas dicas valiosas, incentivo constante e por nunca negarem ajuda quando precisei.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que me concedeu uma bolsa de estudos, fato que muito contribuiu para a viabilização desta tese.

Também deixo aqui expresso o meu agradecimento às agências de fomento pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho: CAPES, CNPq e FAPERJ.

E a Deus acima de tudo, por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente eu não teria chegado até aqui.

Ninguém vence sozinho, obrigada a todos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

Augusto Cury

RESUMO

HEGGENDORNN, Lorraine Herdy. *Potencial de virulência de amostras de Corynebacterium spp. isoladas de pacientes hospitalizados*. 2022. 92 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Nas últimas décadas, as corinebactérias não-diftéricas emergiram como verdadeiros patógenos de infecções nosocomiais e o padrão de resistência destes microrganismos a múltiplas drogas têm sido enfatizado. Entretanto, os mecanismos de virulência destes patógenos não se encontram bem elucidados. Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de virulência de cepas de *Corynebacterium* spp. isoladas de material clínico humano e caracterizar os determinantes genéticos envolvidos com fenótipo de Metallo-Beta-Lactamase (MBL) positivo nas amostras bacterianas estudadas. Neste estudo, foram utilizadas amostras clínicas das espécies *Corynebacterium amycolatum* (3 cepas), *Corynebacterium accolens* (4 cepas), *Corynebacterium minutissimum* (1 cepa) e *Corynebacterium falsenii* (1 cepa). Os ensaios de invasão foram realizados com macrófagos U-937 no intervalo de 3 e 6 horas. O nematódeo *Caenorhabditis elegans* foi empregado como modelo *in vivo* para o ensaio de virulência. Amostras de *Corynebacterium* spp. fenotipicamente produtoras de MBL foram submetidas a técnica da reação em cadeia da polimerase, para a identificação do determinante genético responsável pela resistência bacteriana. Todas as amostras foram capazes de aderir aos macrófagos U-937. Todas as cepas de *Corynebacterium* spp. causaram declínio da curva de sobrevivência de *C. elegans*, quando comparadas à curva de sobrevivência dos nematódeos expostos à cepa controle. Quanto à morfologia e ao desenvolvimento dos nematódeos infectados por *Corynebacterium* spp., 100,0% das cepas apresentaram deformação da região anal (fenótipo *Dar*) e distensão abdominal em *C. elegans*. O fenótipo “Worm bagging” foi observado em todas as amostras testadas. O gene *bla*, que codifica uma beta-lactamase classe A, foi detectado em cepas de *C. amycolatum* multirresistentes. Por fim, as amostras *bla* gene positivas foram encaminhadas para sequenciamento e o resultado depositado no GenBank. Em conclusão, o estudo destaca a relevância de *Corynebacterium* spp. como um patógeno nosocomial multirresistente. De acordo com o conhecimento atual, esta é a primeira identificação de *C. amycolatum* resistente ao imipenem, evidenciando a produção de MBL e gene *bla* positivo. Além disso, os resultados mostraram que a interação entre o nematódeo e *Corynebacterium* spp. resultou em alterações morfológicas que podem fornecer conhecimentos sobre aspectos da patogenicidade bacteriana e mecanismos subjacentes aos processos fisiológicos em humanos. Dessa forma, sugere-se que os programas de vigilância médica incluam estratégias de controle para diminuir os potenciais fatores de risco de infecções nosocomiais por *Corynebacterium* spp.

Palavras-chave: *Corynebacterium* spp. Virulência. *Caenorhabditis elegans*. Macrófagos U-937. Metallo-Beta-Lactamase.

ABSTRACT

HEGGENDORNN, Lorraine Herdy. *Virulence potential of Corynebacterium spp. isolated from hospitalized patients*. 2022. 92 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

In the last decades, non-diphtheritic corynebacteria have emerged as true pathogens of nosocomial infections and the pattern of resistance of these microorganisms to multiple drugs has been emphasized. However, the virulence mechanisms of these pathogens are not well understood. In this perspective, the present work aimed to investigate the virulence potential of *Corynebacterium* spp. isolated from human clinical material and to characterize the genetic determinants involved with a Metallo-Beta-Lactamase (MBL) phenotype in our bacterial strains. In this study, clinical strains of *Corynebacterium amycolatum* (3 strains), *Corynebacterium accolens* (4 strains), *Corynebacterium minutissimum* (1 strain) and *Corynebacterium falsenii* (1 strain) were studied. Assays of adherence and invasion to the U-397 macrophage lineage were performed at 3 and 6 hours. The nematode *Caenorhabditis elegans* was used as an *in vivo* model for the virulence assay. *Corynebacterium* spp. phenotypically producing MBL were submitted to the polymerase chain reaction technique to identify the genetic determinant responsible for bacterial resistance. All samples showed adherence to the macrophage lineage U-937. All strains of *Corynebacterium* spp. caused a decline in the survival curve of *C. elegans*, when compared to the survival curve of nematodes exposed to the control strain. Regarding the morphology and development of the nematodes infected by *Corynebacterium* spp., 100.0% of the strains caused deformation of the anal region (*Dar* phenotype) and abdominal distension. The “worm bagging” phenotype was observed for all strains tested. The *bla* gene, which encodes a class A beta-lactamase, was detected in multidrug-resistant strains of *C. amycolatum*. In conclusion, the study highlights the relevance of *Corynebacterium* spp. as a multidrug-resistant nosocomial pathogen. To the best of our knowledge, this is the first identification of imipenem-resistant *C. amycolatum*, showing the production of MBL and positive for *bla* gene. Finally, the *bla* gene was sequenced and the result deposited in GenBank. Furthermore, the results showed interaction between the nematode and *Corynebacterium* spp. resulted in morphological changes that may provide insights into aspects of bacterial pathogenicity and mechanisms underlying physiological processes in humans. Thus, it is suggested that medical surveillance programs include control strategies to reduce potential risk factors for nosocomial infections by *Corynebacterium* spp.

Keywords: *Corynebacterium* spp. Virulence potential. *Caenorhabditis elegans*. Cellular interaction. Metallo-beta-lactamase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática das distâncias entre os substratos e os agentes quelantes utilizados para a detecção fenotípica de amostras produtoras de MBL.....	40
Figura 2 –	Teste fenotípico para detecção de MBL em amostras de <i>Corynebacterium amycolatum</i> pelo método de disco aproximação.....	51
Figura 3 –	Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes <i>bla</i> e <i>ampC</i> , codificadores de uma beta-lactamase de classe A e de uma beta-lactamase do tipo <i>ampC</i> , respectivamente.....	53
Figura 4 -	Interação bacteriana (<i>Corynebacterium spp.</i>) em cultura de células U-937.....	55
Figura 5 –	Percentuais de associação e viabilidade intracelular de amostras de <i>Corynebacterium spp.</i> em macrófagos U-937.....	58
Figura 6 –	Alterações morfológicas (distensão abdominal e prolapso retal) em <i>Caenorhabditis elegans</i> após infecção com <i>Corynebacterium spp.</i>	60
Figura 7 –	Curvas de sobrevivência de <i>C. elegans</i> expostos a cepas de <i>Corynebacterium spp.</i> e <i>E. coli</i> (OP50) por até 7 dias.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados referentes às cepas de <i>Corynebacterium</i> spp. analisadas neste estudo...	37
Tabela 2 –	Descrição dos alvos, sequências e tamanhos dos produtos do PCR simplex para beta-lactamases.....	41
Tabela 3 –	Perfil epidemiológico das amostras de <i>Corynebacterium</i> spp. isoladas de pacientes hospitalizados na Casa de Saúde São Lucas, no período de setembro/2015 a Agosto/2016, e incluídas neste estudo.....	49
Tabela 4 –	Caracterização de bacilos Gram-positivos irregulares pela técnica de MALDI-TOF MS, segundo o <i>score</i> de identificação.....	50
Tabela 5 –	Número e percentual de bacilos Gram-positivos irregulares identificados pelo MALDI-TOF MS, de acordo com o <i>score</i> de identificação.....	50
Tabela 6 –	Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das amostras de <i>Corynebacterium</i> spp. estudadas neste trabalho.....	52
Tabela 7 –	Análise da interação bacteriana (<i>Corynebacterium</i> spp.) em macrófagos U-937.....	56
Tabela 8 –	Alterações morfológicas, no desenvolvimento reprodutivo e comportamento dos nematódeos infectados com diferentes cepas de <i>Corynebacterium</i> spp.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Ágar Chocolate Telurito
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGPs	Bacilos Gram-positivos
BGPIs	Bacilos Gram-positivos Irregulares
BHI	Brain Heart Infusion
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DMEM	Dulbecco Modified Essential Médium
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
G+C	Guanina e Citosina
HEMO	Hemocultura
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICS	Infecções da Corrente Sanguínea
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ISC	Infecção do Sítio Cirúrgico
LBAL	Lavado Broncoalveolar
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
MBL	Metallo-Beta-Lactamase
MDR	Multidrug resistance/Resistência multidroga
MPA	Ácido 2- mecaptopropiônico
MS	Mass Spectrometry
MS*	Ministério da Saúde
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Solução salina tamponada com solução de Sorensen
PBS-D	PBS modificado por Dulbecco
PHE	Public Health England
SEC VAG	Secreção Vaginal
SFC	Secreção de Ferida Cirúrgica
SFB	Soro Fetal Bovino

TSA	Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana
TSA*	Tryptone Soya Agar
TSB	Tryptone Soya Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPO	Unidade Pós-Operatória
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VB	Vaginose Bacteriana

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	34
1.1	Geral	34
1.2	Específicos	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Considerações éticas	36
2.2	Origem das amostras bacterianas	36
2.3	Identificação por Maldi-Tof	37
2.3.1	<u>Preparação da amostra</u>	38
2.4	Perfis de sensibilidade aos agentes antimicrobianos	38
2.4.1	<u>Detecção da produção de metalo-beta-lactamase por disco aproximação</u>	39
2.5	Detecção de genes codificadores de beta-lactamases em amostras de <i>Corynebacterium amycolatum</i>	40
2.5.1	<u>Extração do DNA bacteriano</u>	40
2.5.2	<u>Identificação das beta-lactamases produzidas pelas amostras do estudo</u>	41
2.5.3	<u>Eletrofore em gel agarose</u>	42
2.5.4	<u>Sequenciamento dos genes de resistência <i>bla</i> e <i>ampC</i></u>	42
2.6	Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA	42
2.7	Interação bacteriana com células monocíticas humanas U-937	43
2.7.1	<u>Origem da linhagem celular utilizada</u>	43
2.7.2	<u>Manutenção da linhagem celular U-937</u>	43
2.7.3	<u>Preparação do Inóculo Bacteriano</u>	43
2.7.4	<u>Infecção das monocamadas celulares</u>	44
2.7.5	<u>Teste qualitativo de aderência em macrófagos U-937</u>	44
2.7.6	<u>Teste quantitativo de aderência e invasão aos macrófagos U-937</u>	44
2.8	Modelo experimental de interação <i>in vivo</i> empregando <i>C. elegans</i>	45
2.8.1	<u>Cepas e linhagem</u>	45
2.8.2	<u>Cultivo, manutenção e crescimento do nematódeo</u>	45
2.8.3	<u>Técnica de sincronização de <i>C. elegans</i></u>	46
2.8.4	<u>Infecção do nematódeo</u>	46
3	RESULTADOS	48
3.1	Dados clínicos e epidemiológicos das amostras utilizadas neste estudo	48

3.2	Identificação por MALDI-TOF MS	49
3.3	Teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos	51
3.3.1	<u>Detecção da produção de metalo-beta-lactamase por disco aproximação</u>	51
3.3.2	<u>Detecção das beta-lactamases produzidas pelas amostras de <i>Corynebacterium amycolatum</i> pela técnica de reação em cadeia da polimerase</u>	53
3.3.3	<u>Identificação molecular de <i>Corynebacterium amycolatum</i></u>	54
3.3.4	<u>Confirmação do gene <i>bla</i></u>	54
3.3.5	<u>Números de acesso</u>	54
3.4	Interação de cepas de <i>Corynebacterium</i> spp. com macrófagos U-937	55
3.4.1	<u>Análise qualitativa</u>	55
3.4.2	<u>Análise quantitativa</u>	56
3.5	Análise do potencial de virulência de cepas de <i>Corynebacterium</i> spp. em ensaio de interação com o nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i>	59
4	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73

INTRODUÇÃO

Corinebactérias constituem um grupo de bacilos Gram-positivos irregulares (BGPI), aeróbios, imóveis, não esporulados, catalase-positivos, que podem provocar infecções tanto em seres humanos como em animais, sendo os sintomas clínicos variáveis de acordo com a espécie envolvida (Seto *et al.*, 2008). Os principais sítios de infecção são: sistema urinário e respiratório inferior; feridas cirúrgicas; lesões cutâneas, abscessos, além do sangue, sobretudo associado ao uso de cateter (Brasil, 2013; Camello *et al.*, 2003; Funke & Bernard, 2011; Martins *et al.*, 2014; Neemuchwala *et al.*, 2018; Zasada & Rzeckowska, 2019).

Infecções humanas por espécies do gênero *Corynebacterium*, têm sido relatadas em diversos países, independente do grau de desenvolvimento (Brasil, 2013; Zasada & Rzeckowska, 2019). Estas infecções podem levar ao óbito, tanto pacientes imunocomprometidos, como imunocompetentes. O aumento do número de amostras multirresistentes aos antimicrobianos tradicionalmente adotados na prática clínica e o número crescente de infecções de diferentes origens, por vezes culminando em óbito, têm contribuído para aumentar o interesse por este grupo de microrganismos (Brasil, 2013; Sariadji *et al.*, 2018).

Diversas espécies de corinebactérias constituem a microbiota anfibiônica, de humanos e animais e são capazes de atuar como patógenos oportunistas. Pacientes imunocomprometidos, portadores de dispositivos vasculares, submetidos a longos períodos de hospitalização e estadia em casas de repouso são mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecções provocadas por estes microrganismos (Bernard, 2012; Funke & Bernard, 2011; Silva-Santana *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas, as corinebactérias tem chamado a atenção dos microbiologistas devido ao seu melhor reconhecimento taxonômico em amostras clínicas, acesso a modernas técnicas de diagnósticos e ao aumento de relatos de casos associando-as com infecções em humanos e animais. Por outro lado, os mecanismos de patogenicidade ainda precisam ser elucidados, principalmente para os microrganismos recém-descritos (Badell *et al.*, 2020; Bernard, 2012; Camello *et al.*, 2003; Osterwalder *et al.*, 1986; Rozdzinski *et al.*, 1991; Sampedro *et al.*, 2014; Van der Lelie *et al.*, 1995; Weinstein, 1997; Zasada & Mosiej, 2018).

Quanto à resistência a múltiplas drogas, a pressão seletiva que ocorre no ambiente hospitalar gera consequências para o sucesso do tratamento de infecções humanas por corinebactérias, especialmente em indivíduos idosos e em pacientes imunodeprimidos. Bactérias multirresistentes reduzem a eficácia do tratamento e os enfermos permanecem

infectados por mais tempo. Isto propicia a propagação destes microrganismos à outras pessoas (Ramos, 2014; Schroder *et al.*, 2012).

Dentre as principais espécies de relevância clínica, os clones multirresistentes de *C. jeikeium*, *C. amycolatum* e *C. urealyticum* têm sido ressaltados (Ramos, 2014; Renom *et al.*, 2007; Rodríguez-Cadenas *et al.*, 2021). Além disso, o aumento da resistência aos antimicrobianos nas espécies *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium afermentans* e *Corynebacterium macginley*, variações geográficas na frequência de isolamento e na resistência natural e adquirida são fatores preocupantes, uma vez que estes microrganismos têm sido crescentemente relatados como patógenos nosocomiais (Baio *et al.*, 2013; Belmares *et al.*, 2007; Knox & Holmes, 2002; Martins *et al.*, 2009; Ramos, 2014; Silva-Santana *et al.*, 2021).

Gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* foi descrito por Lehmann & Neumann em 1896, pertence à classe *Actinobacteria*, a qual também pertencem aos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*, sua ordem é *Mycobacteriales* e a família é *Corynebacteriaceae*. Etimologicamente, *Corynebacterium* deriva do grego korune, uma “clava” e do latim bakterium, um “bacilo pequeno”, logo, bacilo pequeno em formato de clava (Lehmann & Neumann 1896; Murray, 2009). Dentre os microrganismos corineformes, o gênero *Corynebacterium* é o que possui maior número de espécies, compreendendo 136 no total (Disponível em: <http://www.bacterio.net> acessado em 31 de agosto de 2022), sendo pouco mais de 50 espécies consideradas de relevância médica (Brasil, 2013; Dangel *et al.*, 2019; Souza, 2013).

Microrganismos do gênero *Corynebacterium* possuem parede celular com resíduos de arabinose, galactose e ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP). Além disso, a maioria das espécies apresenta ácidos micólicos de cadeias curtas (22 a 36 átomos de carbono) (Funke *et al.*, 1997; Khamis *et al.*, 2004). Estas bactérias não são álcool-ácido-resistentes e na coloração de Gram são observados bacilos Gram-positivos irregulares agregados ou em cadeias curtas. Granulações metacromáticas, que são reservas de fosfatos de elevada energia, estão presentes no interior das células e podem ser visualizadas por técnicas de coloração especiais (Biberstein *et al.*, 1994; Murray, 2009).

As corinebactérias são produtoras da enzima catalase, não formam esporos, são imóveis e exibem morfologia celular pleomórfica, podendo se apresentar sob as formas cocobacilar, bacilar e filamentosas, seja individualmente, em pares e/ou paliçadas. (Baron *et al.*, 1994; Biberstein *et al.*, 1994; Dangel *et al.*, 2019). Muitas espécies crescem bem em meios de cultura comerciais, comumente utilizados nos laboratórios, tais como: ágar sangue, BHI (*Brain Heart Infusion*) ágar e TSA (*Trypticase Soy Agar*). No entanto, algumas espécies de bactérias lipofílicas requerem meios suplementados com lipídios para que ocorra o crescimento *in vitro* (Murray, 2009).

Os microrganismos corineformes estão amplamente distribuídos na natureza. Estes microrganismos já foram isolados em habitats diversos, como solo e vegetais. Além disso, estas bactérias possuem uma grande variedade de hospedeiros, tais como: tartarugas, gatos, cães, focas, cabras, vacas, ovinos e seres humanos. Muitas espécies são associadas a doenças humanas clássicas, por exemplo: *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria. Outras espécies são reconhecidas como agentes patogênicos oportunistas, isolados a partir de amostras clínicas provenientes do trato geniturinário, respiratório, sangue e feridas cirúrgicas (Feurer *et al.*, 2004; Leal, *et al.*, 2016; Samaranayake, 2006).

Muitas corinebactérias são encontradas em sítios específicos. Algumas espécies são comensais constituindo a microbiota da pele, ao passo que, outras são isoladas a partir de lesões cutâneas específicas. *C. diphtheriae*, por exemplo, pode alojar-se na nasofaringe e em lesões cutâneas, que atuam como reservatórios e favorecem a disseminação da difteria. Por outro lado, *C. amycolatum* e *C. striatum* são parte da microbiota da pele e faringe de indivíduos saudáveis; *Corynebacterium auris* está presente no canal auditivo externo de seres humanos e *Corynebacterium jeikeium* é comumente isolado de pacientes hospitalizados (Meyer & Rebolli, 2010).

Infecções por corinebactérias potencialmente produtoras de toxina diftérica

Diversas espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium* encontram-se bem estabelecidas como verdadeiros patógenos. *C. diphtheriae* é o patógeno humano mais bem caracterizado deste gênero e o principal agente etiológico da difteria clássica, uma doença infectocontagiosa, de evolução aguda e com manifestações locais e sistêmicas. A difteria permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade em diferentes continentes,

até mesmo em países com programas efetivos de imunização infantil (Bitragunta *et al.*, 2010; Galazka, 2000; Khan *et al.*, 2007, Wang & London, 2009). A doença afeta principalmente o trato respiratório, sendo potencialmente fatal devido à ação de uma exotoxina, denominada toxina diftérica (TD). Tal toxina apresenta tropismo para o miocárdio, sistema nervoso central, sistema renal e glândulas suprarrenais (Galazka *et al.*, 1995; Sariadji *et al.*, 2018).

Embora desde a década de 40 exista o programa de vacinação contra a difteria, a doença ainda é considerada um sério problema de Saúde Pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), continuam os surtos da doença tanto em países em desenvolvimento, como em países industrializados. Além disso, a difteria permanece endêmica em diversas partes do mundo, sobretudo em países em desenvolvimento, tais como: Índia, Vietnã, Caribe e países da América (Vieira *et al.*, 2019). No Brasil, foram registrados 45 casos de difteria nos últimos dez anos.

Além de *C. diphtheriae*, as espécies *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* também são capazes de produzir a toxina diftérica. *C. ulcerans* foi isolado pela primeira vez em 1926, por Gilbert e Stewart, a partir da lesão de garganta de um paciente com quadro de doença respiratória diftérica (Trost *et al.*, 2011). Esse microrganismo é o agente etiológico de quadros diversos de infecções em animais, sobretudo de mastites em bovinos. Contudo, também pode ser o agente etiológico de necroses em mucosas e síndromes do trato respiratório inferior, como pneumonia e formações de nódulos pulmonares (Hatanaka, 2003) em outras espécies de animais, tais como: cães, gatos, porcos, cavalos, lontras, macacos e javalis.

A difteria de natureza zoonótica e infecções extrafaríngeas (lesões de pele, pneumonia e linfonodo abscesso) causadas por *C. ulcerans* têm sido reportadas em diversos países, incluindo o Brasil (Simpson-Louredo *et al.*, 2019). Os primeiros casos de infecções em humanos por *C. ulcerans* foram associados ao consumo de leite e derivados crus. A partir da década de 1980, o número de casos de difteria de natureza zoonótica causada por esta espécie aumentou significativamente. Na Inglaterra, a título de exemplo, o número de casos de difteria ocasionada por *C. ulcerans* foi maior do que o registrado pelo *C. diphtheriae*. Geralmente, esta infecção acomete pacientes parcialmente imunizados para a difteria (Bonmarin *et al.*, 2009; Simpson-Louredo *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2010).

C. pseudotuberculosis é o agente etiológico de diversas doenças de cunho veterinário, dentre as quais a linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes, como carneiros e cabras. A doença se apresenta como abscessos cutâneos, pneumonia, artrite, pericardite e mastite. Esse microrganismo também pode estar envolvido em infecções que causam linfadenite em cavalos e linfangite ulcerativa em vacas (Baird & Fontaine, 2007). Dessa forma, há grande interesse

veterinário e econômico no controle de tal infecção (Kuria *et al.*, 2001). Embora infecções por *C. pseudotuberculosis* raramente acometam o ser humano, casos de linfadenite, relacionados a infecções ocupacionais, já foram reportados em trabalhadores rurais que possuem contato frequente com o rebanho ou trabalhadores de abatedouros (Guimarães *et al.*, 2011). Na Austrália, por exemplo, foram descritos dez casos de infecção humana por *C. pseudotuberculosis*, confirmando sua presença em áreas de criação de ovelhas e carneiros (Peel *et al.*, 1997). Em humanos, os sinais e sintomas da infecção por *C. pseudotuberculosis* são semelhantes ao da LC e a transmissão ocorre geralmente por contato com animais doentes ou ingestão de carne ou leite contaminados (Trost *et al.*, 2012).

Por fim, técnicas de sequenciamento genético permitiram a descrição de mais duas espécies do gênero *Corynebacterium* potencialmente produtoras de toxina difteria: *C. belfantii* e *C. rouxi* (Hoefler *et al.*, 2021; Pivot *et al.*, 2019).

Infecções por corinebactérias não-produtoras de toxina diftérica

Infecções causadas por microrganismos corineformes têm sido relatadas com frequência crescente (Camello *et al.* 2003; Camello *et al.* 2009; Dinleyici *et al.*, 2010; Kawasaki *et al.*, 2014; Osterwalder *et al.*, 1986; Rodzinski *et al.*, 1991; Silva-Santana *et al.*, 2021; Sugumaran *et al.*, 2021; Wojewoda *et al.*, 2012; Zasada & Rzezkowska, 2019). Estes microrganismos têm sido reportados como agentes etiológicos de infecções graves, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, portadores de dispositivos vasculares e pacientes hospitalizados durante longos períodos (Baio *et al.*, 2013; Bernard, 2012; Gardenier *et al.*, 2012; Godet *et al.*, 2012; Karunakaran *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012; Perkin *et al.*, 2012; Portocarrero *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2019; Riviere *et al.*, 2012; Silva-Santana *et al.*, 2021; Tarr *et al.*, 2003).

Além das corinebactérias potencialmente produtoras de toxina, que são patógenos obrigatórios para os seres humanos e/ou animais (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. belfantii*, *C. rouxi* e *C. silvaticum*), inúmeras espécies não produtoras de toxina podem estar presente na microbiota anfibiônica humana e, conseqüentemente, atuar como patógenos oportunistas, causando infecções urinárias, endocardite, meningite, infecções respiratórias, entre outras (Fernández-Natal *et al.*, 2008; Kharseeva & Voronina, 2016; Leal *et al.*, 2016; Marull & Casares, 2008; Ordóñez-Palau *et al.*, 2007; Prete *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2019; Silva-Santana *et al.*, 2021; Sugumaran *et al.*, 2021).

Durante vários anos a patogenicidade de corinebactérias não diftéricas (CND) foi subestimada. Muitas cepas isoladas de materiais clínicos humanos, especialmente de hemoculturas, eram descartadas como meros contaminantes, tendo em vista a presença de tais microrganismos na microbiota anfibiótica humana. Entretanto, esta visão vem sendo modificada nas últimas décadas, devido à maior disponibilidade de ferramentas que possibilitam uma identificação mais rápida e precisa destes microrganismos, as correlações das espécies isoladas com o potencial patogênico e o aumento de relatos de casos associando estes microrganismos com infecções em humanos e animais (Kharseeva & Voronina, 2016; Leal *et al.*, 2016; Ramana *et al.*, 2014; Sugumaran *et al.*, 2021; Zasada & Mosiej, 2018). Embora seja crescente o número de artigos que descrevam CND como agentes etiológicos de infecções diversas, os mecanismos de virulência destes patógenos ainda não foram esclarecidos.

Quatro espécies não-produtoras de TD de importância clínica, *C. xerosis*, *C. striatum*, *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium amycolatum* formam o complexo XSMA. Estas espécies são usualmente identificadas em ambiente hospitalar e já foram isoladas de sítios anatômicos diversos. A diferenciação entre as espécies é possível a partir do emprego de técnicas moleculares e testes fenotípicos adicionais não utilizados rotineiramente nos laboratórios clínicos, uma vez que os microrganismos apresentam características fenotípicas pouco distintas (Renaud *et al.*, 1998; Wauters *et al.*, 1998).

Na última década, espécies como *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. minutissimum* e *Corynebacterium urealyticum* foram relatadas como agentes etiológicos de infecções com maior frequência. Estes microrganismos têm sido associados a múltiplas infecções, tais como: infecções da corrente sanguínea, endocardites, infecções de próteses (sobretudo válvulas cardíacas), infecção do trato urinário, meningites, infecção derivada de neurocirurgia, abscessos cerebrais, peritonites, osteomielites, artrite séptica, empiema, infecção ocular e pneumonia (Carvalho *et al.*, 2018; Sugumaran *et al.*, 2021; Zasada & Mosiej; 2018). Além disso, inúmeros são os casos nos quais CND foram isoladas a partir de lesões da pele e de feridas, isoladamente ou na presença de outras espécies bacterianas. O aumento do número de relatos de infecções humanas por CND levou os microbiologistas a considerá-las como potenciais agentes patogênicos (Ramana *et al.*, 2014).

Corynebacterium amycolatum

C. amycolatum é a terceira espécie do gênero *Corynebacterium* isolada com maior frequência em materiais clínicos. O microrganismo está emergindo como patógeno, sobretudo em hospedeiros imunocomprometidos (Carvalho *et al.*, 2018; Ghosh *et al.*, 2012; Lagrou *et al.*, 1998; Sugumaran *et al.*, 2021). É também frequentemente resistente aos antimicrobianos, característica que contribui para a sua distinção de outras espécies no diagnóstico microbiológico (Esteban *et al.*, 1999; Oteo *et al.*, 2001). Algumas amostras inicialmente caracterizadas como *C. xerosis*, *C. minutissimum* e/ou *C. striatum* foram posteriormente descritas como *C. amycolatum* (Funke & Bernard, 2007).

Esta corinebactéria é reconhecida como agente etiológico de infecções nosocomiais, que incluem septicemia, endocardite de prótese valvar e infecções do sítio cirúrgico. Este microrganismo também pode ocasionar infecção urinária, infecção vaginal e infecção ocular (Funke & Bernard, 2007; Ghosh *et al.*, 2012; Sampedro *et al.*, 2014; Sugumaran *et al.*, 2021; Vanechoutte *et al.*, 1998). Além disso, frequentemente apresenta multirresistência frente aos antimicrobianos dos grupos: beta-lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, quinolonas, lincosamidas e rifampicinas (Adderson *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2018; Funke & Bernard 2007).

Corynebacterium accolens

C. accolens é uma corinebactéria lipofílica. Infecções humanas provocadas por esta espécie têm sido relatadas com baixa frequência na literatura. Em parte, isto se deve aos métodos laboratoriais tradicionais de identificação empregados na rotina laboratorial, o que pode levar ao diagnóstico equivocado, uma vez que favorece o crescimento de microrganismos facilmente cultivados, em detrimento de microrganismos fastidiosos, como *C. accolens*.

Quanto à resistência aos agentes antimicrobianos, Ang & Brown (2007) reportaram *C. accolens* isolada de abscesso mamário resistente à penicilina G e sensível à vancomicina. Nhan *et al.* (2012) reportaram cepas de *C. accolens* resistentes à eritromicina provenientes de espécimes respiratórios, com um alto percentual de resistência às cefalosporinas de terceira geração. Microrganismos com este mesmo perfil de resistência também já foram isolados a

partir de feridas, amostras endocervicais, escarro e swabs de orofaringe (Koneman *et al.*, 2008; Menberu *et al.*, 2021).

Corynebacterium falsenii

C. falsenii é reconhecido como um potencial patógeno humano (Bernard *et al.*, 2002). O microrganismo já foi isolado a partir da cultura de fluidos corporais normalmente estéreis, sendo três isolados obtidos a partir de hemoculturas e um isolado em cultura de líquido cefalorraquidiano (Sjödén *et al.*, 1998). Esta espécie também foi encontrada em animais, como águias e cegonhas (Fernández-Garayzábal *et al.*, 2003; Fernández-Garayzábal *et al.*, 2004). Em 2010, *C. falsenii* foi isolado a partir de culturas de sangue e também da ponta do cateter central, em crianças em terapia com vancomicina (Tam, Fisher & Miller, 2010).

Corynebacterium minutissimum

C. minutissimum já foi reportado como agente etiológico de infecções diversas, tais como: endocardite, septicemia, abscessos (Coyle & Lipsky 1990; Williams, Selepak & Gill, 1993), pielonefrite (Ahmad & Ahmad, 2005), infecções relacionadas a cateter (Cavendish *et al.*, 1994; Rupp *et al.*, 1998), peritonite (Fernández & Girón *et al.* 1998) e eritrasma (Groves *et al.*, 2021). A literatura reporta taxas variadas de infecções causadas por *C. minutissimum*, tanto para o microrganismo isolado a partir de hemoculturas, como para sua capacidade de colonizar cateteres e como foco de bacteremia. Este microrganismo pertence ao complexo XSMA (*C. xerosis*, *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. amycolatum*) e a metodologia convencional não é suficiente para concluir sua identificação na categoria de espécie, sendo necessário o emprego de testes adicionais, tais como: susceptibilidade ao agente vibriostático O/129 (150 µg/disco - 2,4-diamino-6,7-disopropylpeptidina), fermentação da glicose a 20°C e 42°C e a hidrólise da tirosina, mesmo utilizando o sistema de galerias de identificação API CoryneSystem. Dessa forma, é provável que a prevalência deste microrganismo seja amplamente subestimada (Alatoon *et al.*, 2012; Konrad *et al.*, 2010; Chandran, *et al.*, 2016; Verroken *et al.*, 2014).

Atualmente, a técnica de MALDI-TOF tem sido empregada no diagnóstico de corinebactérias de maneira acessível e eficaz.

Corynebacterium xerosis

C. xerosis constitui a microbiota anfibiótica do saco conjuntival (Porschen *et al.*, 1977). Poucos são os relatos de infecção em seres humanos por esta espécie. A maioria dos isolados quando previamente identificados por *C. xerosis* são subsequentemente reconhecidos como *C. amycolatum*, devido à proximidade filogenética entre tais espécies (Wauters *et al.*, 1998). Contudo, *C. xerosis* já foi relacionado à infecção de sítio cirúrgico (Marti *et al.*, 2008), sepse (Cattani *et al.*, 2000), abscesso cerebral (Wooster *et al.*, 1999), endocardite (Pessanha *et al.*, 2003) e infecção ventriculo-peritoneal materna após cesariana (Hocaoğlu *et al.*, 2019).

Virulência bacteriana

A pele íntegra é uma importante barreira natural, uma vez que impede à penetração de microrganismos em nosso corpo. Poucos microrganismos possuem a capacidade de invadir a pele intacta. A pele apresenta pH moderado (pH 5.0 a 6.0), o ambiente é relativamente seco e possui microbiota residente, logo é um ambiente pouco propício à proliferação de microrganismos patogênicos. Geralmente, a porta de entrada aos invasores se dá pela picada de insetos, traumas ou procedimentos intravenosos.

As membranas mucosas, por sua vez, podem apresentar imunoglobulina G e imunoglobulina A secretória, capazes de aglutinar microrganismos e bloquear seus receptores celulares, o que dificulta a aderência. Secreções mucóides contêm quantidades significativas de proteínas, denominadas proteínas ligadoras de ferro, que diminuem a disponibilidade de íons ferro, necessários ao crescimento microbiano, o que compromete a incorporação do ferro livre pelas bactérias patogênicas. Em contrapartida, a microbiota normal da pele dispõe de mecanismos próprios para a captação desse ferro (Fernandes & Ribeiro, 2000).

O processo infeccioso é iniciado a partir da interação entre o microrganismo e o hospedeiro. A capacidade do microrganismo de colonizar superfícies cutâneo-mucosas do

hospedeiro é considerada como um importante mecanismo de patogenicidade de inúmeras bactérias (Ofek & Doyle, 1994). Para que um microrganismo consiga se instalar, alguns fatores são necessários, tais como a presença de estruturas de superfície bacterianas envolvidas na captação de nutrientes nos tecidos, ativação do sistema de defesa, degradação de substratos e adaptação das bactérias ao ambiente (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1998, Ott *et al.*, 2010). As condições imunológicas gerais do hospedeiro, a dose infectante e a virulência da amostra bacteriana são fatores correlacionados ao sucesso do processo infeccioso (Popovic *et al.*, 2000).

Os microrganismos possuem diferentes adesinas em sua superfície, ou seja, proteínas que medeiam à ligação a receptores e proporcionam a colonização das superfícies. Para as bactérias patogênicas, as adesinas são essenciais para os estágios iniciais da infecção, uma vez que possibilitam o contato com as células hospedeiras e a colonização de diferentes tecidos. O repertório de adesinas expressas por uma bactéria determina o tropismo do patógeno por tecidos e órgãos específicos do hospedeiro. Além disso, a ligação de adesinas bacterianas a receptores de células hospedeiras desencadeia vias de sinalização tanto nas células hospedeiras como bacterianas, que podem determinar se os microrganismos permanecerão no meio extracelular ou se serão internalizados, além de influenciar o tráfico intracelular de bactérias invasoras e sua capacidade de sobreviver e replicar. Dessa forma, a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de adesão celular é imprescindível para a compreensão do desenvolvimento da infecção, sua prevenção e tratamento (Kline & Lewis, 2009; Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006).

Fatores de virulência de corinebactérias

Os recursos utilizados pelos microrganismos para sobreviver, multiplicar e permanecer nas superfícies do hospedeiro são denominados fatores de virulência microbianos. Dentre os fatores de virulência, as bactérias podem utilizar adesinas para sua fixação em células e tecidos do hospedeiro. Dentre as estruturas que possuem função de adesinas, as fímbrias, pili, LPS, proteínas de parede e de membrana externa são capazes de se ligar a receptores específicos na superfície de células eucarióticas (Martins, 2014).

Embora a capacidade de colonizar superfícies do hospedeiro seja um importante mecanismo de patogenicidade para muitas espécies bacterianas (Ofek & Doyle, 1994), poucos estudos foram desenvolvidos com microrganismos corineformes de importância médica.

As investigações mais comuns são voltadas para *C. diphtheriae* através de modelos experimentais diversos (Mattos-Guaraldi, Formiga & Pereira, 2000). O mecanismo de virulência mais conhecido em *C. diphtheriae* é a TD. O efeito citotóxico dessa toxina se deve à inibição da síntese de proteínas, por meio da ribosilação do fator de alongamento EF-2 (Holmes, 2000). A toxina é produzida apenas por amostras que possuam o gene *tox*, carregado por corinefagos do tipo β ou β -relacionados, integrado ao seu cromossomo. O gene *tox* tem sua transcrição negativamente regulada por íons ferro e pela proteína repressora DtxR (*Diphtheria Toxin Repressor*), presente em todas as amostras de *C. diphtheriae* (De Zoysa et al., 2005).

Além da TD, outros fatores de virulência são importantes para o aparecimento e manutenção do processo infeccioso. Proteínas fimbriais e não-fimbriais já foram descritas como possíveis participantes deste processo e carboidratos de superfície, hidrofobinas e trans-sialidases também parecem estar envolvidas (Dias et al., 2011).

Infecções por *C. diphtheriae* em indivíduos imunizados e o crescente número de infecções invasivas causadas por amostras atoxinogênicas tem sido reportado. Estudos demonstraram que amostras de *C. diphtheriae*, independente da capacidade de produzir toxina, podem aderir com intensidade variada a diferentes substratos, seja em células humanas ou em dispositivos médicos (Antunes et al., 2015; Bertuccini et al., 2004; Colombo et al., 2001; Gomes et al., 2009).

No gênero *Corynebacterium*, a presença de fímbrias foi descrita inicialmente para a espécie *Corynebacterium renale* (Yanagawa et al., 1968). Em 1976, pesquisadores observaram um elevado grau de fimbriação em uma única amostra de *C. diphtheriae* (Yanagawa & Honda, 1976), quando foi sugerida a sua participação na aderência a eritrócitos de carneiro, processo denominado hemaglutinação. A partir de então, muitos estudos buscaram sua caracterização estrutural e funcional. A literatura conta com inúmeros trabalhos que descrevem diferentes tipos de fímbrias em amostras de *C. diphtheriae*, além de sortases implicadas na organização das proteínas fimbriais (Gaspar & Ton-That, 2006; Kang et al., 2009; Marrafini et al., 2006; Ton-That & Marrafini, 2004; Ton-That & Schneewind, 2003).

A aderência de *C. diphtheriae* apresenta natureza multifatorial. As amostras possuem tendência a aderir em intensidades variadas a diversos substratos. As propriedades adesivas contribuem como fator de virulência no estabelecimento de infecções causadas por amostras invasoras, produtoras ou não de toxina. A expressão de diferentes adesinas pelo bacilo diftérico é sugerida, devido à diversidade da atividade hemaglutinante e as variações nos percentuais de aderência e internalização celular entre as amostras. Essas diferenças parecem influenciar na patogenicidade e no sítio de infecção das cepas (Hirata Jr et al., 2008).

Através de ensaios de hemaglutinação, a habilidade do bacilo diftérico em aderir à membrana de células eucarióticas foi bastante estudada (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1992; Yanagawa & Honda, 1976). Fímbrias foram visualizadas em uma cepa hemaglutinante do *C. diphtheriae*, sugerindo que tais estruturas estariam relacionadas à propriedade hemaglutinante do microrganismo (Yanagawa & Honda, 1976). Por outro lado, amostras hemaglutinantes do bacilo diftérico, biovars *mitis* (Colombo *et al.*, 2001) e *gravis* (Kostyukova & Pereverzev, 1985), foram submetidas a ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET), no qual não foi observada a presença de fímbrias.

De acordo com Jacques *et al.*, (1988), determinados microrganismos capsulados e hidrofílicos, pertencentes a outros gêneros, possuem propriedades hemaglutinantes que não são mediadas por fímbrias. Para o *C. diphtheriae*, amostras dos biotipos fermentadores e não fermentadores de sacarose, após tratamentos por agentes físicos e químicos, sofreram influências no comportamento dos eritrócitos. A resistência de suas hemaglutininas a enzimas proteolíticas, detergente e ao aquecimento a 100°C sugerem o envolvimento de estruturas de natureza não-fimbrial no processo de aderência às hemácias (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000).

C. diphtheriae pode apresentar três estruturas fimbriais distintas, denominadas Spa (“sortase-mediated pilus assembly”): pilus SpaA, pilus SpaD e pilus SpaH. Cada pilus é formado por três subunidades menores: pilus SpaA (SpaABC), pilus SpaD (SpaDEF), pilus SpaH (SpaGHI). Estas estruturas são polimerizadas e conectadas à superfície celular com a participação de diferentes sortases (Broadway *et al.*, 2013; Gaspar & Ton-That, 2006; Mandilik *et al.*, 2007; 2008; Ton-That & Schneewind, 2003).

Análises moleculares demonstraram que genes codificadores das pilinas e de sortases estão localizados em ilhas de patogenicidade. Em algumas cepas, estes genes estão parcialmente ou completamente ausentes (Iwaki *et al.*, 2010; Trost *et al.*, 2012). O pilus SpaA detectado com maior frequência no gênero *Corynebacterium*, tem sido o principal alvo de estudos sobre o papel de pilinas na virulência de *C. diphtheriae*. O seu envolvimento na aderência às células epiteliais da faringe já foi descrito, assim como sua patogênese no modelo experimental *in vivo* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* para estudos de virulência (Broadway *et al.*, 2013; Mandilik *et al.*, 2007; Zasada *et al.*, 2013) também aludiram a expressão destas estruturas como indispensáveis para a ocorrência de infecções invasivas por amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae*.

Quanto à aderência a superfícies sólidas, estudos sugerem que as fímbrias desempenham papel limitado na aderência do microrganismo à superfícies inertes (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000). A capacidade dos microrganismos corineformes de aderirem ao vidro (carga-positiva),

relaciona-se à produção de polissacarídeos. A aderência ao vidro está geralmente associada à presença do glicocálix em diferentes espécies bacterianas e imagina-se que esta atividade possa ser desempenhada com a participação do ácido siálico (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000). Para o *C. diphtheriae*, foi demonstrado que os carboidratos atuavam como adesinas mediadoras da fixação da espécie ao vidro (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000). Por sua vez, Moreira *et al.* (2003) demonstraram que a limitação do ferro foi capaz de inibir a aderência ao vidro, o número de resíduos de ácido siálico e a expressão de material eletrodenso na superfície bacteriana.

Quanto às proteínas de natureza não-fimbrial, destacam-se as proteínas DIP 1281 (Ott *et al.*, 2010) e DIP 0733 (Sabbadini *et al.*, 2012). A proteína DIP 1281 trata-se de uma invasina que tem sido estudada no processo de interação com células de linhagem epitelial de faringe. Os resultados obtidos indicam que ela está envolvida na organização geral da superfície do bacilo diftérico (Ott *et al.*, 2010). Por sua vez, a proteína DIP0733, participa da aderência a hemácias humanas (Colombo *et al.*, 2001) e a células da linhagem de carcinoma de laringe humana HEP-2 (Hirata *et al.*, 2004). Sabbadini *et al.*, (2012) também demonstraram seu efeito na internalização e indução da apoptose em células HEP-2. Antunes e colaboradores (2015) relataram o papel desta proteína na ligação ao colágeno, fibronectina e fibrinogênio (Fg). Estudos também demonstraram que assim como *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* é capaz de se ligar à fibronectina, colágeno e fibrinogênio (Simpson-Louredo *et al.*, 2014)

Quanto à adesão celular, estudos demonstram que ao aderirem às células HEP-2 estes microrganismos apresentaram padrão de adesão variado (Bertuccini *et al.*, 2004; Hirata Jr *et al.*, 2002). Amostras de *C. diphtheriae* isoladas de casos de difteria podem apresentar os padrões dos tipos adesão localizada e adesão difusa (Hirata Jr *et al.*, 2004). Cepas isoladas a partir de endocardite e pneumonias apresentaram o padrão do tipo adesão agregativa (Filardy, 2005; Hirata Jr *et al.*, 2008), ao passo que uma amostra isolada a partir de uma infecção oriunda de cateter de nefrostomia exibiu o padrão misto de aderência, ou seja, adesão localizada e adesão agregativa (Gomes *et al.*, 2009).

A participação de carboidratos de superfície e proteínas lectínicas nas interações de *C. diphtheriae* com células do hospedeiro também já foi investigada. Mattos-Guaraldi *et al.*, (2000) revelaram que a superfície do bacilo diftérico apresenta diferentes moléculas contendo resíduos de ácido siálico, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, galactose e manose com afinidade para lectina. Os resultados obtidos sugerem que os carboidratos de superfície do bacilo diftérico podem promover alterações na hidrofobicidade e na carga bacteriana,

modulando a aderência a substratos inertes e a células humanas, além de contribuir para a evasão do sistema imune.

Quanto ao processo de internalização, sabe-se que este é dependente do contato e adesão entre microrganismo e célula hospedeira. As estratégias para internalização desenvolvidas pelos patógenos permitem que atravessem barreiras teciduais e proliferem em locais protegidos. Isso evita a ação de antibióticos e promove a evasão de defesas do hospedeiro, como anticorpos circulantes e a ação do sistema complemento, e conseqüentemente, a ocorrência da doença (Bierne *et al.*, 2002).

Acredita-se que o processo de internalização também seja de importância na manutenção do patógeno nas vias aéreas superiores, até que o mesmo assuma uma posição majoritária na microbiota, sendo pressuposta a participação das invasinas. Além da capacidade de aderir aos tecidos do hospedeiro, já foi demonstrado que o bacilo diftérico é capaz de penetrar e sobreviver no interior de células respiratórias humanas HEp-2. Dessa forma, este pode ser um dos fatores que favorecem a manutenção do patógeno nas vias aéreas superiores e inferiores, o que permite a permanência do estado de portador após antibioticoterapia, soroterapia e cura da difteria (Hirata Jr *et al.*, 2002). Além disso, também foi demonstrado que amostras de *C. diphtheriae*, independentemente da produção de toxina, podem ser fagocitadas por macrófagos humanos da linhagem U-937 e permanecer viáveis no compartimento intracelular. Portanto, a sobrevivência intracelular dentro de macrófagos humanos pode contribuir para a disseminação bacteriana por via endovascular e também conferir proteção contra atividades microbicidas mais eficientes de outras células de defesa e contra a ação bactericida de agentes antimicrobianos (Santos *et al.*, 2010).

Mecanismos de internalização também contribuem para o estabelecimento e manutenção de processos infecciosos causados por *C. diphtheriae* (Hirata Jr *et al.*, 2002). Há alguns anos, *C. diphtheriae* era considerado um microrganismo não invasor. Entretanto, diferentes estudos com células epiteliais (Bertuccini *et al.*, 2004; Filardy, 2005; Hirata Jr *et al.*, 2002), endoteliais (Pereira, 2008) e fagocíticas (Santos *et al.*, 2010) demonstraram sua capacidade de internalização e viabilidade intracelular.

Além de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. rouxii* e *C. belfantii* são espécies potencialmente produtoras de TD. Estas espécies são capazes de produzir uma outra exotoxina, denominada fosfolipase D (PLD), cuja atividade esfingomielinásica aumenta a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, promove a disseminação tecidual do microrganismo no hospedeiro (Bonmarin *et al.*, 2009; Pivot *et al.*, 2021). Além disso, essa

exotoxina é capaz de reduzir a viabilidade de neutrófilos e macrófagos (Schmiel & Miller 1999).

Análises moleculares permitiram a detecção de genes relacionados a potenciais fatores de virulência, como catalase, desoxirribonuclease (DNase), neuraminidase (NanH), endoglicosidase (EndoE) e proteases, além da adesina fimbrial do tipo SpaD (DEF) (Trost *et al.*, 2011).

Além da produção de toxinas, amostras de *C. pseudotuberculosis* resistem a diferentes agentes estressores, o que lhes permite sobreviver no ambiente por meses antes de infectar o hospedeiro animal, e no interior de células eucarióticas, principalmente de linhagem fagocítica, nas quais também são capazes de se multiplicar (Baird & Fontaine, 2007; Stefańska *et al.*, 2010). Estudos têm relacionado reguladores transcricionais a estes processos, tais como fatores sigma (δ) alternativos da RNA polimerase e lipídios de parede celular (Moraes *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2012). Dentre os fatores δ , o δE tem sido o mais estudado. Este regulador é importante para a resistência da espécie ao estresse oxidativo induzido por óxido nítrico e peróxido, determinante para a sobrevivência no interior de fagócitos (Pacheco *et al.*, 2012). Os lipídeos associados à parede celular de *C. pseudotuberculosis* são semelhantes ao ácido micólico de *Mycobacterium tuberculosis* e foram descritos como importantes fatores para a patogênese da doença. Esta camada atua conferindo proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos e confere baixa permeabilidade ao envelope celular, barreira natural contra antibióticos (Portevin *et al.*, 2004).

Macrófagos U-937 como modelo de interação bacteriana

Os macrófagos normalmente representam um maior obstáculo à infecção. A atividade antimicrobiana do macrófago é mediada, principalmente, por um conjunto de moléculas reativas que possuem atividade bactericida tanto *in vivo* como *in vitro* (Halliwell & Gutteridge, 2000; Nathan & Shiloh, 2000). A linhagem de células monocíticas humana U-937 deriva de fluido pleural de pacientes com linfoma histiocítico difuso (Hattori *et al.*, 1983). Estas células expressam as mesmas características que monócitos e macrófagos humanos.

Macrófagos U-937 são utilizados como um notável modelo experimental, para estudos de mecanismos de adesão e também em ensaios imunológicos (Larrick *et al.*, 1980; Melewicz *et al.*, 1982; Pradhan *et al.*, 2020). As interações entre bactérias e macrófagos determinam o

curso da maioria das doenças infecciosas. Dessa forma, o estudo dos mecanismos de virulência de corinebactérias isoladas em infecções humanas torna-se tema de grande interesse, pois isto poderá subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção de tais infecções.

Caenorhabditis elegans* como modelo de interação *in vivo

Caenorhabditis elegans é um nemátodeo da família *Rhabditidae* que mede cerca de 1 milímetro de comprimento e vive normalmente no solo (Brenner, 1974; Wood, 1988). Em 1974, *C. elegans* foi introduzido como modelo animal para estudos biológicos (Sifri, Begun & Ausubel, 2005). Este modelo possui inúmeras vantagens, tais como: fácil manipulação e cultivo, transparência, rápido tempo de geração e baixo custo (Souza *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2012). Nos estudos de interação bactéria-hospedeiro *in vivo*, o modelo de estudo empregando *C. elegans* tem se mostrado eficiente na mimetização do processo de patogênese em mamíferos, já que permite avaliar o potencial patogênico de cepas bacterianas e aspectos da imunidade inata que são conservados entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados (Ferreira *et al.*, 2014; Powell & Ausubel, 2008; Souza *et al.*, 2019).

C. elegans já foi empregado como modelo de interação *in vivo* para o estudo da patogênese de algumas espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. Este modelo foi utilizado para a caracterização da virulência em cepas de *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* (Ott *et al.*, 2012). Apesar da difusão de *C. elegans* como modelo de interação *in vivo* para o estudo de corinebactérias, algumas delas produtoras de toxinas diversas, os mecanismos de virulência para espécies recém-descritas ainda não se encontram bem elucidados.

Multirresistência bacteriana

A redução da eficácia dos antimicrobianos no tratamento de infecções comuns tem limitado as alternativas terapêuticas. Em países desenvolvidos, o uso prolongado de altas dosagens de antibióticos em hospitais, na comunidade e na agricultura, tem contribuído para o aparecimento e para a manutenção de cepas resistentes, o que promove o uso de

antimicrobianos mais caros e de espectro estendido. Por outro lado, em países emergentes o uso crescente destes medicamentos se deve a altas taxas de hospitalização e alta prevalência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Laxminarayan & Heymann, 2012).

A resistência bacteriana constitui um problema de saúde pública mundial. O aumento do número de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos tradicionalmente adotados na prática clínica, tem contribuído para aumentar o interesse pelas corinebactérias (Brasil, 2013; Silva-Santava et al., 2021). Diferentes padrões de susceptibilidade antimicrobiana foram observados para este grupo de microrganismos, inclusive cepas multirresistentes produtoras de beta-lactamases (Alibi et al., 2017; Byram et al., 2006; Dragomirescu et al., 2020; Turk et al., 2009; Ramana et al., 2014; Williams et al., 1993).

A classe de antimicrobianos mais amplamente utilizada é a dos beta-lactâmicos. Tratamentos bem sucedidos de infecções por *C. striatum* com penicilina ou amoxicilina já foram relatados. Entretanto, a baixa susceptibilidade à penicilina e cefotaxima, entre outros beta-lactâmicos é frequente. Todavia, o mecanismo genético responsável pela resistência ainda não se encontra caracterizado (Alibi et al., 2017; Otsuka et al., 2006).

A hidrólise dos beta-lactâmicos por beta-lactamases é o mecanismo mais comum de resistência para esta classe de agentes antibacterianos em bactérias clinicamente importantes. Corinebactérias resistentes à penicilina podem estar relacionadas à presença de um gene *bla* que codifica uma beta-lactamase de classe A, mas também à presença do gene *ampC*, que codifica uma beta-lactamase de classe C, como previamente detectado em cepas de *C. striatum* resistentes à penicilina. Lembrando que o gene *ampC* se encontra amplamente distribuído em enterobactérias que codificam enzimas ativas contra penicilinas e cefalosporinas (Alibi et al., 2017).

Dentre as corinebactérias de relevância clínica, clones multirresistentes de *C. amycolatum*, *C. jeikeium* e *C. urealyticum* já foram reportados na literatura. Variações geográficas na frequência de isolamento e na resistência natural e adquirida, além do aumento na resistência aos agentes antimicrobianos nas espécies *C. minutissimum*, *C. xerosis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. afermentans* e *C. macginley* também já foram observados (Belmares et al., 2007; Dragomirescu et al., 2020; Knox & Holme, 2002; Ramos et al., 2019; Renom et al., 2007).

Dentre os beta-lactâmicos, os carbapenêmicos são importantes opções terapêuticas utilizadas no tratamento de infecções nosocomiais (Quinteira et al., 2005; Woodford et al., 2000). Todavia, o uso indiscriminado de carbapenêmicos no ambiente hospitalar ocasiona maior pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial, o que favorece a seleção de

microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a estes antimicrobianos (Gales *et al.* 2003).

Mecanismos que conferem resistência à maioria dos beta-lactâmicos, tais como a produção de metalo-beta-lactamases (MBL), tem sido relatados (Poirel & Nordmann, 2002). Além disso, genes que codificam MBL, tais como: SPM-1 (São Paulo metalo-beta-lactamase), IMP-1,2,3,4,5,6 e 7 (Imipenemase), VIM-1 e 2 (Verona Imipenemase), GIM-1 (Imipenemase da Alemanha), SIM-1 e 2 (Seul Imipenemase) já foram descritos em patógenos clinicamente importantes, tais como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (Hong *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2000; Riccio *et al.* 2000). Entretanto, a literatura carece desta abordagem quanto aos microrganismos corineformes.

Justificativa

Nas últimas décadas, infecções ocasionadas por corinebactérias têm sido relatadas com frequência crescente (Camello *et al.* 2009; Dinleyici *et al.*, 2010; Kawasaki *et al.*, 2014 Osterwalder *et al.*, 1986; Rodzinski *et al.*, 1991; Wojewoda *et al.*, 2012; Silva-Santa *et al.*, 2021; Zasada & Rzeczowska, 2019). Estes microrganismos têm ocasionado infecções graves, sobretudo em pacientes submetidos a procedimentos invasivos e a longos períodos de hospitalização.

Evidências sobre a patogenicidade de bactérias corineformes como causa de IRAS são crescentes. Inúmeros são os esforços mundialmente dedicados à compreensão dos mecanismos de patogenicidade destes microrganismos (Aragão *et al.*, 2021; Sampedro *et al.*, 2014). Sabe-se que os mecanismos de adesão às células do hospedeiro são essenciais para estabelecer a infecção, pois dispõe o patógeno no tecido alvo. Após a adesão, as bactérias podem permanecer localizadas extracelularmente (Molinari & Chhatwal, 1999). Entretanto, pode haver internalização por fagocitose e alguns patógenos bacterianos conseguem induzir sua internalização por células não fagocitárias, mecanismo conhecido como invasão (Finlay, 1990).

Estudos sobre mecanismos de virulência de corinebactérias isoladas de infecções humanas são de grande importância. A tendência é o aumento do número de IRAS por estas bactérias nos próximos anos. Tal fato é atribuído ao número crescente de pacientes com patologias graves, muitas das vezes utilizando cateteres venosos centrais, expostos a tratamentos imunossupressores, acompanhado da admissão de múltiplos antibióticos e submetidos a longos períodos de hospitalização (Sampedro *et al.* 2014; Zasada & Rzeczowska, 2019).

Investigar o potencial de virulência de cepas de *Corynebacterium* spp., a partir da interação com macrófagos de linhagem U-937 e com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, como modelos experimentais, e caracterizar os determinantes genéticos envolvidos nas amostras bacterianas com fenótipo de MBL positivo são ferramentas importantes. A identificação de mecanismos de interação deste microrganismo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento destas infecções. Além disso, ligantes expressos na superfície de corinebactérias podem representar alvos importantes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos ou bloqueadores de aderência e/ou invasão (Aragão *et al.*, 2021; Sabbadini, 2006).

O aumento contínuo das taxas de mortalidade, relacionadas às infecções por microrganismos multirresistentes, em proporção mundial, é preocupante. Diversos estudos demonstraram o aumento da resistência de espécies de *Corynebacterium* aos antimicrobianos. Resistência aos beta-lactâmicos, clindamicina, eritromicina, ciprofloxacino e gentamicina já foram relatadas e, por vezes, foi necessário o emprego da vancomicina como droga de escolha (Reddy *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2021; Yoon *et al.*, 2011). O tratamento para infecções ocasionadas por espécies multirresistentes de corinebactérias não está satisfatoriamente estabelecido (Camello *et al.*, 2003; Funke *et al.*, 1997; Funke & Bernard, 2011; Milosavljevic *et al.*, 2021), logo torna-se necessário o estudo destas situações clínicas.

Por fim, o aumento das taxas de mortalidade relacionadas às infecções por microrganismos multirresistentes em todo o mundo é preocupante. A literatura reporta o aumento crescente da resistência de diferentes espécies de *Corynebacterium* frente aos agentes antimicrobianos (Milosavljevic *et al.*, 2021; Reddy *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2021; Yoon *et al.*, 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre a resistência destes microrganismos frente aos carbapenêmicos, logo se torna necessário o estudo destas situações clínicas para direcionar uma terapia antimicrobiana adequada, prevenir IRAS e controlar a dispersão de amostras resistentes.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar o potencial de virulência de cepas de *Corynebacterium* spp. isoladas de material clínico humano (*C. amycolatum*, *C. accolens*, *C. falsenii* e *C. minutissimum*), a partir da interação com macrófagos de linhagem U-937 e com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, como modelos experimentais, e caracterizar os determinantes genéticos envolvidos nas amostras bacterianas com fenótipo de MBL positivo.

1.2 Específicos

Neste sentido, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Confirmar a identificação das cepas de *Corynebacterium* spp. isoladas de pacientes hospitalizados por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).
- 2) Analisar os perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das cepas bacterianas isoladas.
- 3) Confirmar fenotipicamente a produção de metalo-beta-lactamases (MBL) pelas cepas de *C. amycolatum* resistentes ao imipenem.
- 4) Investigar a presença dos genes *bla* e *ampC* nas cepas de *C. amycolatum* resistentes ao imipenem e/ou ceftazidima pela técnica de reação em cadeia da polimerase.
- 5) Comparar os resultados obtidos nos testes fenotípicos para a triagem de MBL com a PCR e correlacionar características clínicas e epidemiológicas.
- 6) Analisar quantitativamente e qualitativamente a associação e viabilidade intracelular de cepas de *Corynebacterium* spp. a macrófagos humanos da linhagem U-937.
- 7) Investigar o potencial patogênico de diferentes espécies de *Corynebacterium* spp. através do ensaio de letalidade em *C. elegans*.
- 8) Avaliar a morfologia e o desenvolvimento dos nematódeos infectados pelas cepas de *Corynebacterium* spp. estudadas.

- 9) Confirmar a identificação de cepas de *C. amycolatum* multirresistentes pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e do gene *bla*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em colaboração com o Laboratório de Microbiologia Experimental, sob a coordenação do Prof. Dr. Helvécio Cardoso Côrrea Póvoa, do Instituto de Saúde de Nova Friburgo, da Universidade Federal Fluminense (UFF).

2.1 Considerações éticas

O presente trabalho foi desenvolvido de acordo com as diretrizes éticas do governo brasileiro, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. O projeto foi submetido à Plataforma Brasil, para apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Pólo Universitário de Nova Friburgo, atual Instituto de Saúde de Nova Friburgo, da Universidade Federal Fluminense. O projeto foi retirado da análise ética e dispensado da apreciação da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) por não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, Parecer: 2.177.078, CAAE: 67843417.1.0000.5626.

2.2 Origem das amostras bacterianas

No estudo foram utilizadas amostras clínicas das espécies *C. amycolatum* (3 cepas), *C. accolens* (4 cepas), *C. minutissimum* (1 cepa) e *C. falsenii* (1 cepa) isoladas de pacientes hospitalizados (2015-2016), pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, DPMI/UERJ (Tabela 1). As amostras são mantidas estocadas a – 20°C em Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid™) acrescido com 20% de glicerol.

Os microrganismos (9 cepas clínicas) foram previamente identificados por métodos bioquímicos convencionais e, em seguida, por espectrometria de massa (MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight, Bruker Daltonics™, França). Os perfis

de sensibilidade aos antimicrobianos foram previamente determinados, utilizando-se o método de difusão em disco (Kirby-Bauer, 1966) em inóculo equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, conforme ao descrito na literatura (CLSI, 2021; Dias *et al.*, 2010; Martínez-Martínez, Ortega & Suarez, 1995; Sariadji *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Dados referentes às cepas de *Corynebacterium* spp. analisadas neste estudo.

Cepa	Data do isolamento	Sítio	Sexo/Idade	Setor	Microrganismo associado
28	02/10/15	SFC	M/64	UPO	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
29	02/10/15	LBAL	F/74	CTI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
59	30/10/15	LBAL	F/74	CTI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
80	24/11/15	LBAL	M/29	CTI	Leveduras
134	26/01/16	SEC. VAG.	F/22	Quarto Particular	<i>Enterococcus faecalis</i>
144	05/02/16	HEM O	F/78	UPO	-
173	22/03/16	LBAL	M/89	CTI	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
275	08/07/16	LBAL	F/67	CTI	<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>

Legenda: HEMO: hemocultura; LBAL: Lavado Broncoalveolar; SEC VAG: secreção vaginal; SFC: Secreção de Ferida Cirúrgica; F: feminino; M: masculino; CTI: Centro de Tratamento Intensivo; UPO: Unidade Pós-operatória; -: nenhum microrganismo associado ao BGPI isolado;

Fonte: A autora, 2022.

2.3 Identificação por MALDI-TOF MS

As amostras previamente caracterizadas por testes bioquímicos convencionais foram identificadas através da metodologia de matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Wissembourg, France).

2.3.1 Preparação da amostra

As amostras foram descongeladas e as bactérias foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco™) ou caldo BHI suplementado com Tween™ 80 (Sigma®), por 24 ou 48 h, de acordo com a necessidade nutricional do microrganismo estudado.

Posteriormente, as amostras foram semeadas por técnica de esgotamento no meio ágar sangue (Columbia Agar Base Difco™ acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro). Após 24 ou 48 h de crescimento, com auxílio de uma alça estéril, uma colônia de cada amostra foi colocada em duplicata nos poços da placa de MALDI-TOF MS e a ordem da disposição das amostras foi anotada.

Cada lâmina de aço continha três grupos de aquisição com 16 poços, possibilitando a análise de 48 amostras diferentes. Após a inserção da colônia de cada cultivo bacteriano recente em cada poço, este foi coberto com 1µl da solução matriz saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e deixado secar à temperatura ambiente. A lâmina de aço foi então inserida no equipamento. O espectro de massa gerado foi comparado com banco de dados de referência e o resultado (score) emitido analisado (Paim *et al.*, 2013).

2.4 Perfis de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizado utilizando-se o método de difusão em disco (Kirby-Bauer). Utilizou-se inóculo equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, conforme descrito na literatura (CLSI, 2021; Dias *et al.*, 2010; Martínez-Martínez, Ortega & Suarez, 1995). O inóculo foi semeado em ágar Mueller-Hinton (Difco™), suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, em atmosfera ambiente. Para as estirpes de crescimento lento, a leitura final foi realizada com 48h.

Os seguintes antimicrobianos (Oxoid™), indicados rotineiramente nas infecções por microrganismos Gram-positivos, foram testados: penicilina G 10 U (PEN), ampicilina 10 µg (AMP), ampicilina-sulbactam 10 µg (ASB), amoxicilina-clavulanato 20 µg (AMC), cefotaxima 30 µg (CTX), imipenem 10 µg (IMP), eritromicina 15 µg (ERI), clindamicina 2 µg (CLI),

tetraciclina 30 µg (TET), ciprofloxacina 5 µg (CIP), gentamicina 10 µg (GEN), rifampicina 5 µg (RIF), trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg (SXT) e vancomicina 30 µg (VAN).

As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021), para outros microrganismos que não sejam *Haemophilus sp.* e *Neisseria gonorrhoeae*. Para os halos de penicilina G e ampicilina foram utilizados os diâmetros estabelecidos para *Staphylococcus sp.*, devido à ausência de pontos de interrupção aceitos para bactérias corineformes, dentro das categorias interpretativas estabelecidas pelas diretrizes do CLSI (Camello *et al.*, 2003; Martinez-Martinez, 1995; Martins *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2008). As amostras que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano de três categorias diferentes foram reportadas como multirresistentes.

2.4.1 Detecção da produção de metalo-beta-lactamase por disco aproximação

Por fim, foi realizado o teste para a detecção de produção de metalo-beta-lactamase (MBL) por disco-aproximação. As amostras resistentes ao imipenem foram submetidas à avaliação da produção de MBL por meio do método de disco-aproximação, de acordo com os protocolos propostos por Arakawa *et al.* (2000) e Lee *et al.* (2005).

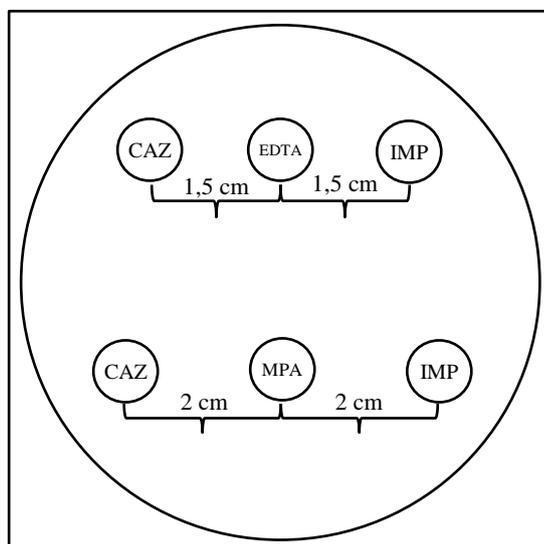
Foram realizadas suspensões bacterianas em salina estéril a 0,85%, com turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. As suspensões foram semeadas com o auxílio de swabs estéreis, em placas contendo meio de ágar Mueller-Hinton (Difco™) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

Posteriormente, foram posicionados na placa discos contendo ceftazidima 30 µg (CAZ, Oxoid™), imipenem 10 µg (IMP, Oxoid™) e discos estéreis de papel de filtro impregnados com 3 µL de uma solução de ácido 2-mercaptopropiônico (MPA) (1,2 g/mL, Merck®) ou 10 µL de uma solução 0,5M de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH = 8.

As distâncias (centro a centro) entre os discos de antimicrobianos e os discos de papel de filtro que receberam os agentes quelantes utilizados foram de 1,5 cm (disco impregnado com EDTA) e de 2 cm (disco impregnado com MPA) (Figura 1).

As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24h. Os microrganismos de crescimento lento foram incubados por 48h.

Figura 1 - Representação esquemática das distâncias entre os substratos e os agentes quelantes utilizados para a detecção fenotípica de amostras produtoras de MBL.



Legenda: CAZ: ceftazidima; IMP: Imipenem; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; MPA: ácido 2- mecaptopropiônico.

Fonte: A autora, 2022.

2.5 Detecção de genes codificadores de beta-lactamases em amostras de *Corynebacterium amycolatum*

2.5.1 Extração do DNA bacteriano

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 48 horas. A partir da cultura de cada isolado, 2 mL foram transferidos para um microtubo. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento foi resuspenso em 500 µL de água milli-Q estéril e submetido a banho-maria fervente (100°C) durante 15 minutos. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. Posteriormente, o material foi descongelado e

centrifugado (14000 rpm por 15 segundos). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C e posteriormente utilizado na reação da PCR (Baio, 2013).

2.5.2 Identificação das beta-lactamases produzidas pelas amostras do estudo

As amostras do estudo foram testadas para uma beta-lactamase de classe A e uma betalactamase do tipo *ampC*. Cada reação de PCR teve volume final de 25 µL, sendo 12 µL de GoTaq® Master Mix Colorless 2X (Promega, EUA), 2 µL de cada primer (10µmol/µL), 2 µL de DNA e o restante de água sem DNase. Os iniciadores, alvos e tamanhos esperados dos produtos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos alvos, sequências e tamanhos dos produtos do PCR simplex para beta-lactamases.

PCR	Alvo	Nome do iniciador	Sequência Oligonucleotídica (5'-3')	Tamanho do produto (pb)
Simplex bla-A	<i>bla</i>	bla-F	CAGTCTAGCCACTTCGCCAAT	808
		bla-R	TGACTGCACGGATGGAGATGG	
Simplex AmpC	<i>ampC</i>	ampC-F	CAATCGGATTCCTGGTCGCT	965
		ampC-R	TGGTTCGCGTGATGTTTTTCG	

Legenda: PCR, *Polymerase Chain Reaction*; F, *forward*; R, *reverse*; pb, pares de base.

A amplificação para a reação de PCR simplex para *bla* e *ampC* foi realizada através de uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 7 minutos; seguida por uma etapa de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

2.5.3 Eletrofore em gel agarose

Os amplicons foram aplicados em um gel a 2% de agarose (Invitrogen®) em tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5X (1X – 89 mM tris, 89 mM ácido bórico e 0,05 M EDTA [pH 8,2]) corado com brometo de etídeo a 1 µg/mL (Sigma®) e a corrida eletroforética foi a 100 volts. A obtenção das imagens dos géis foi realizada com o auxílio do ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences®).

2.5.4 Sequenciamento dos genes de resistência *bla* e *ampC*

Para as amostras positivas para amplificação dos genes, os produtos obtidos foram purificados com o sistema ExoSAP-IT (ThermoFisher Scientific, EUA) em volume final de 21 µL, sendo 15 µL dos produtos e 6 µL da enzima. As reações foram incubadas a 37 °C por 15 minutos e 80 °C por 15 minutos. Os produtos purificados pela metodologia de Sanger foram enviados para sequenciamento, utilizando o sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems, Estados Unidos da América). As sequências obtidas foram analisadas com o software Geneious R10 (Biomatters Ltd., Nova Zelândia) e comparadas com as sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos da América) através da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.6 **Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA**

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada de acordo com protocolos previamente descrito por Khamis (2004). As reações de sequenciamento foram realizadas usando BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, EUA) seguindo protocolo padrão. A sequência do gene 16S rRNA foi comparada com as sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos da América) através da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7 Interação bacteriana com células monocíticas humanas U-937

2.7.1 Origem da linhagem celular utilizada

Neste trabalho, foram utilizadas células de linhagem “human macrophage-like” ATCC U-937, obtidas a partir da coleção de células do DMIP/UERJ.

2.7.2 Manutenção da linhagem celular U-937

Os macrófagos U-937 foram cultivados em *Dulbecco Modified Essential Medium* (DMEM, Sigma®, Estados Unidos da América) contendo 100UI/mL de penicilina e 25 mcg/mL de gentamicina e 10% soro fetal bovino inativado (SFB 10%, Gibco®, Estados Unidos da América). As células U-937 foram semeadas em microplacas de cultura de células com 24 orifícios contendo lamínulas de vidro, na concentração de $5,0 \times 10^5$ células por poço adicionado de 250 ng/mL de PMA (*Phorbol Myristate Acetate*; Sigma®) para induzir diferenciação e aderência. Após 48h, o meio de cultura contendo células não aderentes foi descartado e as células U-937 aderidas foram incubadas por 24h em DMEM completo 10% SFB sem PMA (Sundstrom & Nilsson, 1976; Santos *et al.*, 2010).

2.7.3 Preparação do Inóculo Bacteriano

As amostras foram cultivadas em 3 mL de caldo TSB (Oxoid™) e incubadas a 35°C por 48h. As células bacterianas foram lavadas três vezes com PBS-D (PBS modificado por Dulbecco) e 1 mL dos cultivos bacterianos foram transferidos para microtubos de 2mL e centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em DMEM (Sigma) até alcançar a D.O. 0.2 em $\lambda = 660\text{nm}$ (MOI 100). Em seguida,

foram retirados 20 μL da suspensão bacteriana que foi diluída (até a 5^o diluição), sendo que 10 μL de cada diluição foram plaqueados em TSA, em triplicatas.

2.7.4 Infecção das monocamadas celulares

A interação com o tapete celular foi realizada através da adição de 100 μL da suspensão bacteriana, sobre os macrófagos após três lavagens prévias do tapete com PBS-D (pH 7,2). As monocamadas infectadas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, durante 3 e 6 horas.

2.7.5 Teste qualitativo de aderência em macrófagos U-937

Ao término do período de incubação, o conteúdo de cada poço foi desprezado e a monocamada celular lavada com PBS-D por seis vezes. Em seguida, as lamínulas foram fixadas com formol (Merck, Alemanha) durante 1 hora, expostas ao metanol (Merck), durante 30 segundos e coradas durante 16h com Giemsa, Brasil (1:10). Por fim, as lamínulas foram lavadas em água destilada, secas a temperatura ambiente, montadas em lâminas de vidro e submetidas à microscopia óptica e os resultados foram obtidos através da determinação dos padrões de aderência (Hirata Jr. *et al.*, 2002; Hirata Jr. *et al.*, 2004).

2.7.6 Teste quantitativo de aderência e invasão aos macrófagos U-937

Após o período de interação de 3 e 6 horas, alíquotas do meio de cultivo celular foram reservadas para a contagem de bactérias viáveis livres no sobrenadante. Os tapetes foram então lavados 4 vezes com 500 μL de PBS-D, para eliminação das bactérias não associadas e de resíduos do meio de cultivo celular. Em seguida, foram adicionados 500 μL de PBS-D contendo 0,1% de Triton X100 (Biorad Laboratories, Richmond, Ca, Estados Unidos da América) por 30 segundos em cada poço, para que as células fossem lisadas. Alíquotas de 10 μL de cada

sobrenadante previamente reservado e dos lisados celulares foram diluídas (razão 10) e plaqueadas em meio TSA (Himedia®, Brasil) para a contagem de bactérias viáveis associadas ao tapete celular (Hirata *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2001). As placas foram incubadas a 37°C durante 48h, para que a contagem das UFC fosse então realizada.

Ao término do intervalo de infecção, alguns poços foram selecionados e expostos a 500µL de uma solução de gentamicina (150 µg/mL) durante 1 hora para que bactérias extracelulares aderidas às monocamadas fossem eliminadas (exclusão pela gentamicina), permitindo assim a contagem de bactérias internalizadas.

As contagens permitiram a determinação do número de bactérias com localização intracelular. Os percentuais de aderência e invasão foram calculados a partir das relações entre os números de bactérias associadas e/ou internalizadas com as contagens de bactérias viáveis no sobrenadante somado ao número de células viáveis associadas às monocamadas (Hirata Jr *et al.*, 2002).

2.8 Modelo experimental de interação *in vivo* empregando *C. elegans*

2.8.1 Cepas e linhagem

Neste estudo foi utilizada a cepa de *C. elegans* Bristol N2 (tipo selvagem - WT), obtida através do *Caenorhabditis* Genetics Center (Minesota, EUA).

2.8.2 Cultivo, manutenção e crescimento do nematódeo

C. elegans foi cultivado em placas de Petri com o meio de crescimento para nematódeos (*Nematode Growth Medium*-NGM) contendo um tapete confluyente de *Escherichia coli* OP50 (esta cepa bacteriana é consumida por *C. elegans* como dieta de manutenção) à temperatura de 23°C. A cepa OP50 foi previamente semeada em caldo TSB a 37°C por 18-24h. A partir da cultura crescida, uma suspensão de 100 µL foi espalhada na superfície de placas contendo meio NGM com auxílio de alça de Drigalski e as placas foram cultivadas a 37°C por 18-24 horas. As

placas de manutenção foram renovadas a cada 7 dias com a transferência dos nematódeos (Brenner, 1974; Ferreira *et al.*, 2014).

2.8.3 Técnica de sincronização de *C. elegans*

A sincronização foi feita a partir de uma placa de manutenção contendo vermes adultos, com 3 a 4 dias de cultivo. A superfície da placa foi lavada com 3 mL de tampão M9 (meio 9) e os nematódeos ressuspensos na solução.

Alíquotas de 1 mL da suspensão contendo os nematódeos foram transferidos para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 6800 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, 500 µL do sobrenadante foram removidos e substituídos por 100µL de NaOH 1M e 200 µL de hipoclorito de sódio a 5%. O tubo foi homogeneizado e mantido em agitação por 90 segundos. Em seguida, 1 mL de tampão M9 foi adicionado. A suspensão foi centrifugada (7200 rpm por 1 minuto), 1 mL do sobrenadante foi removido, 1 mL de tampão M9 foi adicionado e a suspensão novamente centrifugada. Este processo de lavagem foi repetido por mais 3 vezes.

Por fim, os microtubos contendo os animais mortos e os ovos viáveis foram deixados sob agitação em temperatura ambiente por 16-18 horas. Neste período ocorreu a eclosão dos ovos e obtenção de vermes vivos em fase larval L1. Foram coletados 200 µL da suspensão que foi distribuída ao redor do tapete de OP50 crescido em meio NGM (placa de manutenção). Após 64-70 horas a 20°C, os nematódeos em fase larval L4 foram visualizados em estereoscópio no aumento de 40X e utilizados nos experimentos (Ferreira *et al.*, 2014; Voisine *et al.* 2007).

2.8.4 Infecção do nematódeo

Nove amostras clínicas de *Corynebacterium* spp., cepas controle *C. diphtheriae* ATCC 27010 e ATCC 27012 e a cepa *E. coli* OP50 foram inoculadas em TSB sem glicose por 24 horas a 37°C. Vinte microlitros de cada cultura bacteriana foram semeadas em *spot* no centro de placas de Petri (60mm) contendo o meio NGM e incubadas a 37°C por 24h. Com o auxílio de agulha microbiológica e estereoscópio, 20 vermes em fase larval L4 foram transferidos para cada placa teste, em triplicata de cada cepa estudada e do controle negativo (*E. coli* OP50). As

placas-teste contendo *C. elegans* expostos aos tapetes bacterianos foram incubadas a 23°C durante 7 dias. A cada 24h foi realizada a contagem dos nematódeos vivos, mortos e desaparecidos das placas. O comportamento, o desenvolvimento e a morfologia corporal também foram observados (Antunes *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2014; França *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2019).

Os experimentos foram repetidos por três vezes e os resultados foram expressos comparando-se o percentual de vermes vivos nas placas testes com os percentuais do controle negativo da cepa controle OP50 e do controle positivo *C. diphtheriae* gene *tox*⁺ (ATCC 27012/EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Dados clínicos e epidemiológicos das amostras utilizadas neste estudo

No presente estudo, foram utilizadas 09 amostras de *Corynebacterium* spp., sendo *C. accolens* [04 amostras (29, 59T, 80 e 173 – todas provenientes de lavado broncoalveolar)], *C. amycolatum* [03 amostras (28 – secreção de ferida cirúrgica, 59B – lavado broncoalveolar e 134 – secreção vaginal)], *C. minutissimum* [01 amostra (144 – hemocultura)] e *C. falsenii* [01 amostra (275 – lavado broncoalveolar)].

De acordo com os dados clínicos obtidos, dentre os pacientes que apresentaram processos infecciosos ocasionados por corinebactérias, 5/8 (62,50%) pertenciam ao sexo feminino, 7/8 (87,50%) com idade a partir dos 64 anos, e 5/8 (62,50%) encontravam-se no centro de tratamento intensivo (CTI) (Tabela 3). É importante relembrar que neste estudo foram isoladas 09 amostras de *Corynebacterium* spp., a partir de 08 pacientes, já que as amostras 59B e 59T foram isoladas do mesmo paciente.

Tabela 3- Perfil epidemiológico das amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de pacientes hospitalizados na Casa de Saúde São Lucas, no período de Setembro/2015 a Agosto/2016, e incluídas neste estudo.

Amostra	<i>Corynebacterium</i> spp.	Espécime Clínico	Sexo	Idade	Setor
28	<i>C. amycolatum</i>	Secreção de Ferida Cirúrgica	M	64	Unidade pós-operatória
29	<i>C. accolens</i>	Lavado Broncoalveolar	F	74	Centro de Tratamento Intensivo
59B	<i>C. amycolatum</i>	Lavado Broncoalveolar	F	74	Centro de Tratamento Intensivo
59T	<i>C. accolens</i>	Lavado Broncoalveolar	F	74	Centro de Tratamento Intensivo
80	<i>C. accolens</i>	Lavado Broncoalveolar	M	29	Centro de Tratamento Intensivo
134	<i>C. amycolatum</i>	Secreção Vaginal	F	22	Quarto Particular
144	<i>C. minutissimum</i>	Hemocultura	F	78	Unidade pós-operatória
173	<i>C. accolens</i>	Lavado Broncoalveolar	M	89	Centro de Tratamento Intensivo
275	<i>C. falsenii</i>	Lavado Broncoalveolar	F	67	Centro de Tratamento Intensivo

Legenda: F, sexo feminino; M, masculino

Notas: As amostras 59B e 59T foram isoladas do mesmo paciente.

Fonte: A autora, 2022.

3.2 Identificação por MALDI-TOF MS

A análise dos espectros gerados pela técnica de MALDI-TOF MS, permitiu a identificação das 09 amostras de *Corynebacterium* spp. estudadas. Os resultados desta análise encontram-se dispostos nas Tabelas 4 e 5.

Na Tabela 4, foram apresentados os resultados da caracterização dos microrganismos pela técnica de MALDI-TOF MS, segundo o *score* de identificação. Na tabela 5, os resultados foram classificados em quatro níveis, de acordo com o *score* obtido. Amostras com *score* entre 0.000 – 1.699 foram classificadas como sem identificação, 1.700 – 1.999 com provável identificação do gênero, 2.000 – 2.299 com identificação segura do gênero e provável espécie e 2.300 – 3.000 com alta probabilidade de identificação de espécie. Conforme observado nas

tabelas, a metodologia de MALDI-TOF MS forneceu identificação segura na categoria de gênero e provável espécie para todas as amostras testadas.

Tabela 4 - Caracterização de bacilos Gram-positivos irregulares pela técnica de MALDI-TOF MS, segundo o *score* de identificação.

Amostra	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Score</i>
28	<i>C. amycolatum</i>	2.123
29	<i>C. accolens</i>	2.018
59B	<i>C. amycolatum</i>	2.151
59T	<i>C. accolens</i>	2.293
80	<i>C. accolens</i>	2.045
134	<i>C. amycolatum</i>	2.226
144	<i>C. minutissimum</i>	2.148
173	<i>C. accolens</i>	2.195
275	<i>C. falsenii</i>	2.251

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 5 - Número e percentual de bacilos Gram-positivos irregulares identificados pelo MALDI-TOF MS, de acordo com o *score* de identificação.

<i>Score</i>	Número	Porcentagem (%)
Sem identificação (0.000 – 1.699)	0/9	0
Provável gênero (1.700 – 1.999)	0/9	0
Gênero seguro e provável espécie (2.000 – 2.299)	9/9	100
Alta probabilidade de espécie (2.300 – 3.000)	0/9	0

Fonte: A autora, 2022.

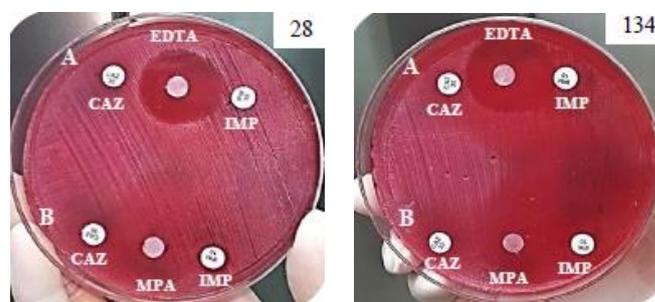
3.3 Teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade frente aos agentes antimicrobianos estão dispostos na Tabela 6. Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos: vancomicina, gentamicina, tetraciclina e rifampicina, enquanto a susceptibilidade aos demais antimicrobianos testados foi variável. *C. accolens* (amostra 80) e *C. amycolatum* (amostras 28, 59B e 134) e apresentaram perfil multirresistente, sendo as amostras 28 e 134 resistentes ao imipenem.

3.3.1 Detecção da produção de metalo-beta-lactamase por disco aproximação

O teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão em disco (Kirby-Bauer, 1966) permitiu a identificação de cepas de *C. amycolatum* resistentes ao antimicrobiano imipenem. Posteriormente, estas cepas foram submetidas ao teste fenotípico para a detecção de MBL, pelo método de disco-aproximação, de acordo com os protocolos propostos por Arakawa *et al.*(2000) e Lee *et al.* (2005). As cepas previamente resistentes ao imipenem apresentaram o fenótipo MBL positivo (Figura 2).

Figura 2 - Teste fenotípico para detecção de MBL em amostras de *Corynebacterium amycolatum* pelo método de disco aproximação.



Legenda: Discos contendo ceftazidima 30 μ g (CAZ), imipenem 10 μ g (IMP) e discos estéreis de papel de filtro (centro) adicionados de 5 μ L de uma solução de EDTA a 100 mM (A) ou 3 μ L de uma solução de ácido 2-mercaptopropiônico (MPA) com a concentração de 1,2 g/mL (B). As distâncias (centro a centro) entre os discos de antimicrobianos e os discos de papel de filtro foram de 1,5 cm (EDTA) e de 2 cm (MPA). A: teste positivo; B: teste negativo.

Fonte: A autora, 2022

Tabela 6 - Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das amostras de *Corynebacterium* spp. estudadas neste trabalho.

Amostras	Antimicrobianos													
	PEN	AMP	TET	RIF	GEN	CFX	IMP	CIP	ERI	CLI	VAN	SUT	ASB	AMC
28*	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R
29	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
59B*	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S
59T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
80*	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
134*	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R
144	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
173	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
275	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S

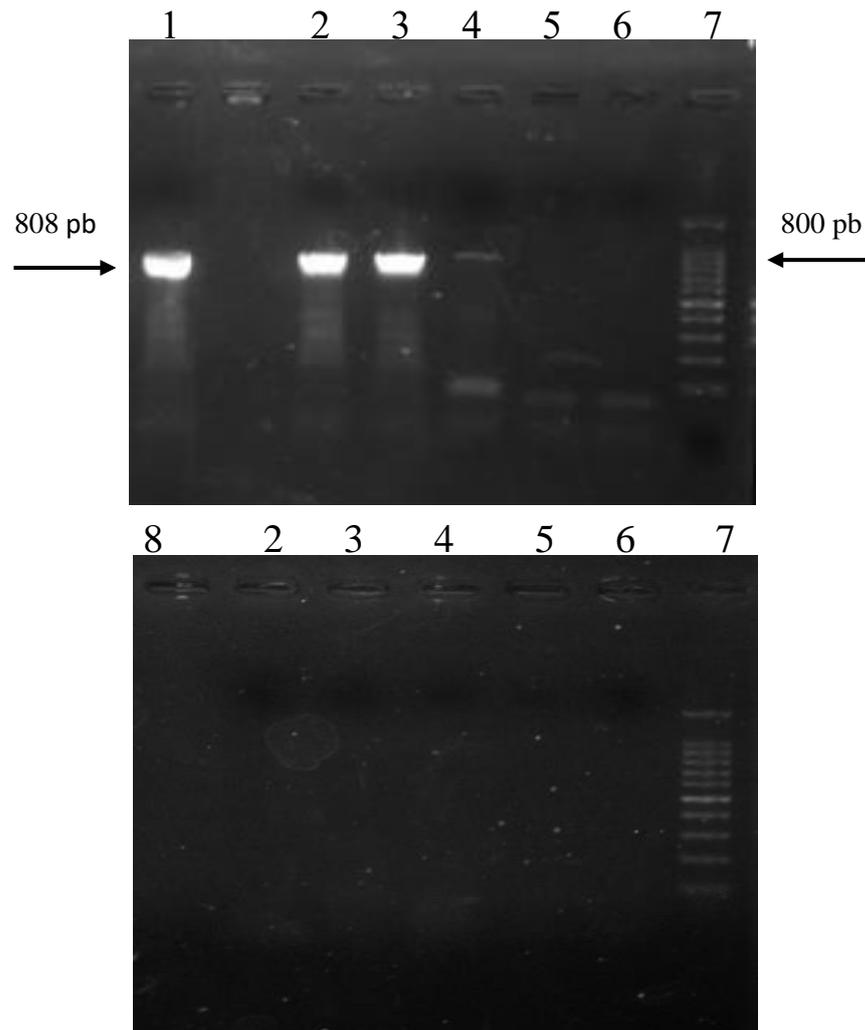
Legenda: PEN: penicilina G; AMP: ampicilina; TET: tetraciclina; RIF: rifampicina; GEN: gentamicina; CFX: cefotaxima; IMP: imepenem; CIP: ciprofloxacino; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; VAN: vancomicina; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim; ASB: ampicilina-sulbactam; AMC: amoxicilina-clavulanato; S: sensível; R: resistente; *, Perfil multiresistente.

Fonte: A autora, 2022.

3.3.2 Detecção das beta-lactamases produzidas pelas amostras de *Corynebacterium amycolatum* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras com fenótipo MBL positivo foram submetidas a técnica de PCR para pesquisa dos genes relacionados à produção de betalactamases. As amostras de *C. amycolatum* resistentes ao imipenem (amostras 28 e 134) foram positivas para o gene *bla*, que codifica uma betalactamase de classe A, e negativas para a betalactamase do tipo *ampC* (Figura 3).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes *bla* e *ampC*, codificadores de uma beta-lactamase de classe A e de uma beta-lactamase do tipo *ampC*, respectivamente.



Legenda: 1 - controle positivo; 2 - *Corynebacterium amycolatum* (cepa 28); 3 - *Corynebacterium amycolatum* (cepa 134); 4 - *Enterococcus faecalis*; 5 e 6 - branco; 7 - peso molecular; 8 - controle negativo

3.3.3 Identificação molecular de *Corynebacterium amycolatum*

As análises resultantes do sequenciamento do gene 16S rRNA evidenciaram valores de similaridade de 98,84% (*C. amycolatum* – amostra 134, também denominada *C. amycolatum* BR-LH-134, após o depósito da sequência no GenBank) e 99,36% (*C. amycolatum* – amostra 28, também denominada *C. amycolatum* BR-LH-28, após o depósito da sequência no GenBank) com *Corynebacterium amycolatum* DSM 6922^T, quando comparadas com as cepas tipo do gênero *Corynebacterium*. As demais sequências relacionadas ao *C. amycolatum* obtiveram resultados abaixo dos pontos de corte propostos para o gene 16S rRNA (Stackebrandt & Goebel, 1994).

Estes resultados corroboram para a identificação dos isolados clínicos deste trabalho para a espécie *C. amycolatum*.

3.3.4 Confirmação do gene *bla*

Após a PCR as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento e após montadas as sequências gênicas foram submetidas ao alinhamento através da plataforma BLAST, cujo os resultados alcançados demonstram identidades e coberturas de 100% para o gene *bla* de diversas espécies do gênero *Corynebacterium*, sendo elas: *Corynebacterium jeikeium* FDAARGOS_574 (CP033784.1), *Corynebacterium striatum* 215 (CP024931.1), *Corynebacterium urealyticum* strain NCTC12011, *Corynebacterium amycolatum* BER245 (CP102778.1), *Corynebacterium diphtheriae* CD1009 (CP091096.1).

3.3.5 Números de acesso

As sequências do gene 16S rRNA dos isolados *C. amycolatum* BR-LH-28 e *C. amycolatum* BR-LH-134 foram depositadas no repositório público GenBank sob os números de acesso OP001419 e OP001418, respectivamente.

Da mesma forma, as sequências do gene *bla* dos isolados *C. amycolatum* BR-LH-28 e *C. amycolatum* BR-LH-134 também foram depositadas no repositório público GenBank sob os números de acesso OP442521 e OP442522, respectivamente.

3.4 Interação de cepas de *Corynebacterium* spp. com macrófagos U-937

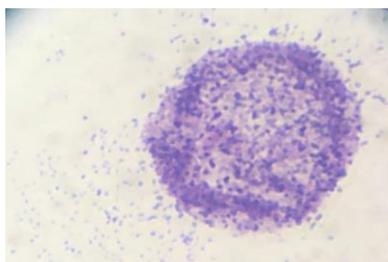
3.4.1 Análise qualitativa

As amostras 28 (*C. amycolatum*), 29 (*C. accolens*), 59B (*C. amycolatum*), 59T (*C. accolens*), 80 (*C. accolens*), 134 (*C. amycolatum*), 144 (*C. minutissimum*), 173 (*C. accolens*) e 275 (*C. falsenii*) foram submetidas ao ensaio qualitativo de interação aos macrófagos U-937. Todas as amostras estudadas foram capturadas pelos macrófagos (Figura 4). Diferentes achados celulares também foram observadas, no tempo de interação de 3 e 6 horas (Tabela 7).

Após a interação das cepas de *C. amycolatum* com macrófagos U-937, foi observado o predomínio de células com núcleo picnótico, tanto após o intervalo de infecção de 3h, como após o ensaio de 6 horas. Já no ensaio utilizando a amostra 275 (*C. falsenii*), foi observado que os macrófagos apresentaram maior integridade celular, após ambos os períodos de incubação testados.

Quanto à interação bacteriana, a amostra 144 (*C. minutissimum*) foi a que apresentou maior número de bactérias aderentes à superfície dos macrófagos. Por fim, no ensaio utilizando *C. accolens* (amostra 80), foi observado maior quantidade de debris celulares e, conseqüentemente, menor número de células U-937 viáveis após os intervalos testados.

Figura 4 – Interação bacteriana (*Corynebacterium* spp.) em cultura de células U-937.



Notas: Imagem gerada por microscopia óptica no aumento de 1000X em imersão.

Tabela 7 - Análise da interação bacteriana (*Corynebacterium* spp.) em macrófagos U-937.

Amostra	Espécie	Interação bacteriana ao tapete celular
28	<i>C. amycolatum</i>	Muitas bactérias aderidas, predomínio de macrófagos com núcleo picnótico.
29	<i>C. accolens</i>	Poucas bactérias aderidas, predomínio de macrófagos viáveis.
59B	<i>C. amycolatum</i>	Algumas bactérias aderidas, predomínio de macrófagos com núcleo picnótico.
59T	<i>C. accolens</i>	Algumas bactérias aderidas, predomínio de células viáveis.
80	<i>C. accolens</i>	Muitas bactérias aderidas, prevalência de debris celulares.
134	<i>C. amycolatum</i>	Muitas bactérias aderidas, predomínio de células com núcleo picnótico.
144	<i>C. minutissimum</i>	Muitas bactérias aderidas, morte celular moderada, bactérias distribuídas uniformemente sobre a superfície celular.
173	<i>C. accolens</i>	Algumas bactérias aderidas, predomínio de células com núcleo picnótico.
275	<i>C. falsenii</i>	Algumas bactérias aderidas, predomínio de células viáveis.

3.4.2 Análise quantitativa

A capacidade de fagocitose foi observada em menor proporção, de acordo com a espécie de *Corynebacterium* spp. testada. O perfil da interação das cepas de *Corynebacterium* spp. e macrófagos U-937, estão apresentados na Figura 5.

As espécies *C. amycolatum* (amostras 28, 59B e 134) foram as que apresentaram maior percentual de adesão e fagocitose. Os perfis de aderência e viabilidade celular foram similares

de acordo com a espécie bacteriana testada. Os resultados das interações estão expressos em percentuais na Figura 5.

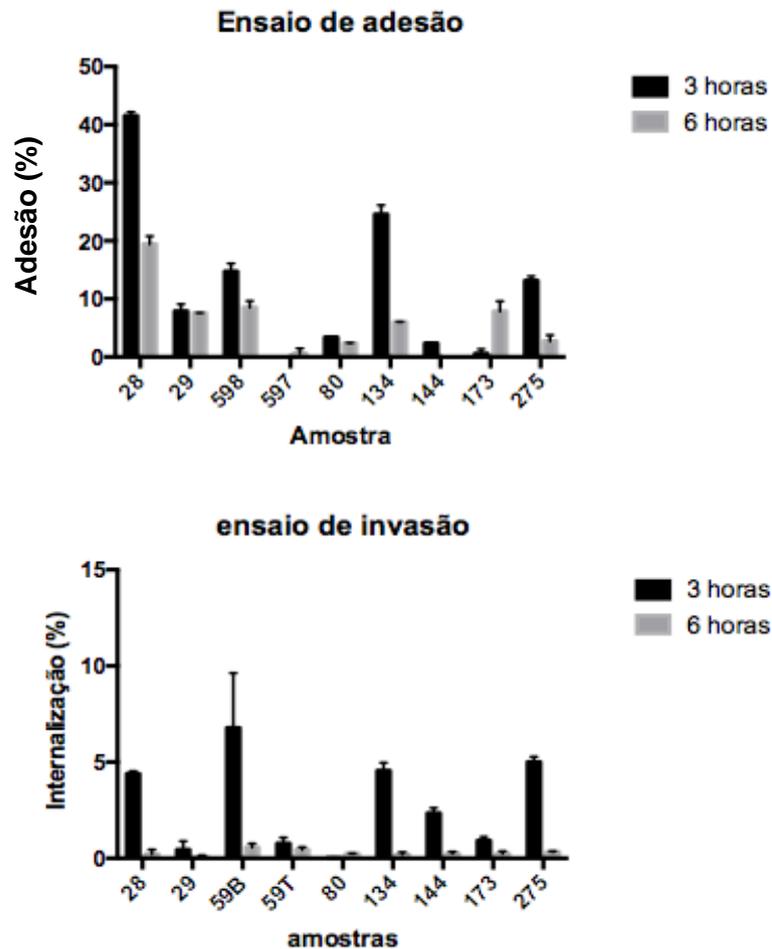
Para os ensaios de exclusão foi utilizada a concentração de 150 µg/mL de gentamicina por 1 hora, já que, de acordo com a literatura, concentrações inferiores são incapazes de eliminar completamente os microrganismos extracelulares viáveis presentes nos sobrenadantes das monocamadas infectadas durante os ensaios de exclusão (Santos, 2008).

Em termos gerais as amostras de *C. amycolatum* (amostras 28, 59B, 134) e *C. falseni* (amostra 275) apresentaram maior percentual de bactérias aderidas as monocamadas de macrófagos U-937 quando comparada as amostras de *C. accolens* (amostras 29, 59T, 80 e 173) nos tempos de infecção analisados. Nos intervalos de tempo testados, as amostras *C. amycolatum* apresentaram valores de aderência percentuais significativamente elevados quando comparadas à amostra *C. accolens* (amostras 29, 59T, 80, 173) e *C. minutissimum* (amostra 144).

Os dados indicam que as amostras de *Corynebacterium* spp. estudadas apresentaram maior capacidade de aderência à superfície nas primeiras 3 horas de infecção das monocamadas ($p < 0,05$), excetuando-se a amostra 173 (*C. accolens*). Nesse período, as amostras de *C. amycolatum* (28, 59B e 134) exibiram maiores valores percentuais (Figura 5), revelando maior capacidade de aderência que as demais amostras testadas.

O percentual de fagocitose das amostras foi maior durante as primeiras 3 horas de ensaio, sendo a amostra 59B (*C. amycolatum*) e 275 (*C. falsenii*) as que apresentaram maior percentual de invasão.

Figura 5 - Percentuais de associação e viabilidade intracelular de amostras de *Corynebacterium* spp. em macrófagos U-937.



Notas: Os percentuais de bactérias viáveis aderidas e internalizadas em macrófagos U-937 foram obtidas através da contagem de UFC's em placa. Os valores apresentados são médias resultantes de ensaios realizados em triplicata e repetidos três vezes. As linhas verticais projetadas acima das barras representam os desvios padrões. Considera-se $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2022.

3.5 Análise do potencial de virulência de cepas de *Corynebacterium* spp. em ensaio de interação com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*

Durante os ensaios de infecção foram observadas alterações na morfologia corporal, desenvolvimento reprodutivo e comportamento dos nematódeos infectados em diferentes intensidades, de acordo com a cepa testada. Como pode ser observado na Tabela 8, todas as cepas de *Corynebacterium* spp. ocasionaram deformações da região anal (fenótipo *Dar*) e distensão abdominal, enquanto 88,88% delas (8/9 cepas) provocaram letargia e 77,78% (7/9 cepas) acarretaram redução na taxa reprodutiva. Adicionalmente, o fenótipo “worm bagging” foi observado em nematódeos expostos a todas as cepas testadas. As alterações morfológicas (*Dar* e distensão abdominal) induzidas pelas cepas de corinebactérias estão ilustradas na Figura 6. Ressalta-se que estas alterações não foram observadas nos nematódeos expostos à cepa controle *E. coli* OP50.

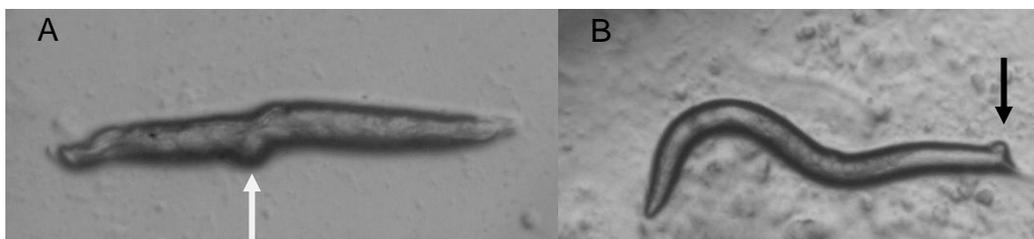
Além de causarem alterações morfológicas, todas as cepas de *Corynebacterium* spp. foram também capazes de afetar a sobrevivência de *C. elegans*. Análises das curvas de sobrevivência apresentadas na Figura 7 revelaram que as cepas 134 (*C. amycolatum*), 173 (*C. accolens*), 275 (*C. falsenii*) e 80 (*C. accolens*) são letais aos nematódeos, diferentemente das cepas 144 (*C. minutissimum*), 59T (*C. accolens*), 59B (*C. amycolatum*), 29 (*C. accolens*) e 28 (*C. amycolatum*).

Tabela 8 - Alterações morfológicas, no desenvolvimento reprodutivo e comportamento dos nematódeos infectados com diferentes cepas de *Corynebacterium* spp.

Cepa	Espécie	Interação bactéria e nematódeo	Distensão Abdominal	Prolapso Retal (<i>Dar</i>)	Letargia	Redução taxa de reprodução
28	<i>C. amycolatum</i>	+	+	+	+	+
29	<i>C. accolens</i>	+	+	+	+	+
59B	<i>C. amycolatum</i>	+	+	+	+	+
59T	<i>C. accolens</i>	+	+	+	+	+
80	<i>C. accolens</i>	+	+	+	+	+
134	<i>C. amycolatum</i>	+	+	+	+	+
144	<i>C. minutissimum</i>	+	+	+	+	-
173	<i>C. accolens</i>	+	+	+	-	+
275	<i>C. falsenii</i>	+	+	+	+	-
OP50	<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-

Fonte: A autora, 2022.

Figura 6 - Alterações morfológicas (distensão abdominal e prolapso retal) em *Caenorhabditis elegans* após infecção com *Corynebacterium* spp.

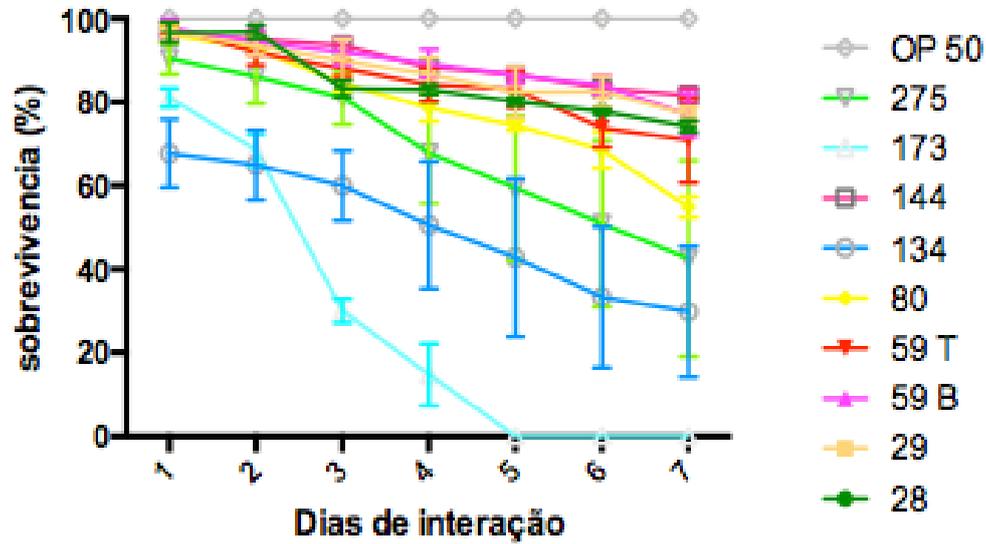


Legenda: Prolapso retal: fenótipo “*Dar*” (seta preta) e distensão abdominal (seta branca) resultantes da infecção por cepas de *Corynebacterium falsenii* (A) e *Corynebacterium accolens* (B).

Notas: Aumento de 4,5X.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 7- Curvas de sobrevivência de *C. elegans* expostos a cepas de *Corynebacterium* spp. e *E. coli* (OP50) por até 7 dias.



Legenda: 28 (*C. amycolatum*), 29 (*C. accolens*), 59B (*C. amycolatum*), 59T (*C. accolens*), 80 (*C. accolens*), 134 (*C. amycolatum*), 144 (*C. minutissimum*), 173 (*C. accolens*), 275 (*C. falsenii*), OP50 (*ATCC E. coli*).

Fonte: A autora, 2022.

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, espécies do gênero *Corynebacterium* expressando perfis MDR têm sido reportadas como agentes etiológicos de infecções nosocomiais, especialmente em pacientes que foram submetidos a longos períodos de hospitalização e/ou aqueles que receberam tratamento com múltiplos agentes antimicrobianos, bem como pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles com síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), transplantes e/ou câncer. Perfis de resistência antimicrobiana têm sido identificados cada vez com maior frequência em *Corynebacterium* spp., sobretudo os patógenos *C. striatum* e *C. amycolatum*. Conseqüentemente, testes de susceptibilidade são necessários para procedimentos terapêuticos eficazes (Baio *et al.* 2013; Carvalho *et al.*, 2018; Silva-Santana *et al.*, 2021).

O presente trabalho enfatizou a relevância das cepas de *C. amycolatum*, que expressam resistência aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica, como agentes etiológicos de infecções nosocomiais independentemente dos sítios clínicos. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que *C. amycolatum* MDR expressando o gene que codifica a β -lactamase classe A foi reconhecido como um patógeno nosocomial emergente. Além disso, características fenotípicas e genotípicas das propriedades de virulência de cepas de *C. amycolatum* também foram verificadas, especialmente os isolados clínicos resistentes à penicilina que apresentavam o gene *bla* codificador da beta-lactamase classe A.

De acordo com a literatura, é comum que cepas de *C. amycolatum* MDR sejam resistentes à penicilina, ampicilina, cefotaxima e eritromicina. A disseminação de patógenos MDR em ambiente hospitalar tem sido preocupante devido ao aumento da taxa de resistência adquirida aos antimicrobianos β -lactâmicos, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina e gentamicina por *C. amycolatum* e outras espécies de *Corynebacterium*. (Borde *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2018; Dragomirescu *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2009; Oteo *et al.*, 2001; Silva-Santana *et al.*, 2021). Além disso, o aumento da pressão seletiva antibacteriana pode ser a razão por trás do aparecimento do gene *bla* positivo de algumas cepas. A pressão seletiva de beta-lactâmicos de ocorrência natural e medicamentosa, devido ao uso excessivo destes fármacos criou um ambiente no qual novas beta-lactamases emergem rapidamente, juntamente com a disseminação de algumas das enzimas mais antigas (Alibi *et al.* 2017).

Diferentes estudos relataram uma alarmante taxa de resistência de espécies de *Corynebacterium* aos beta-lactâmicos (Carvalho *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019; Reddy *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2011). Os beta-lactâmicos são a classe de antimicrobianos mais amplamente utilizada. A hidrólise de antibióticos beta-lactâmicos por beta-lactamases é o mecanismo de

resistência mais comum para esta classe de agentes antibacterianos em bactérias clinicamente importantes (Alibi *et al.*, 2017). A resistência ao imipenem por isolados de *C. striatum* tem sido relatada em alguns países, como Espanha (Gomila *et al.*, 2012; Renom *et al.*, 2014), Brasil (Baio *et al.*, 2013; Ramos *et al.* 2019; Silva-Santa *et al.*, 2021) e Itália (Campanile *et al.*, 2009). No entanto, até onde sabemos, esta é a primeira vez que a resistência ao imipenem foi relatada para cepas de *C. amycolatum*. O uso indiscriminado de carbapenêmicos em pacientes hospitalizados promove pressão seletiva da microbiota humana e favorece a sobrevivência e disseminação de subpopulações de células bacterianas que expressam sensibilidade reduzida ou resistência a esses agentes antimicrobianos (Baio *et al.*, 2013; Borde *et al.*, 2020; Gales *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2019).

A incidência de patógenos bacterianos resistentes a antimicrobianos, que foram isolados de infecções hospitalares é um problema de saúde pública global, incluindo *Corynebacterium* spp. Quando as infecções por *C. amycolatum* estão ligadas a cepas MDR, também são difíceis de tratar. Glicopeptídeos (VAN), linezolida e tigeciclina são ativos contra a maioria das cepas, e a resistência a macrolídeos (ERI) e fluoroquinolonas (CIP) é comum (Chen *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2009). Amostras clínicas de *C. amycolatum* apresentando variações nos padrões de resistência, foram observadas de acordo com o local de isolamento do microrganismo. A cepa *C. amycolatum* (59B), isolada do líquido de lavado broncoalveolar, demonstrou resistência à fluoroquinolona (ciprofloxacina). De acordo com a literatura, as sequências que codificam a subunidade A da enzima girase em *C. amycolatum* mostraram que a resistência às fluoroquinolonas está associada a mutações de natureza espontânea neste gene e depende do número de mutações e do tipo de aminoácido que foram substituídos (Ramos *et al.*, 2019; Sierra *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2011). Estes dados também são valiosos para os profissionais de saúde, desencorajando o uso dessas classes de antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas pelos patógenos *C. amycolatum* e *C. striatum*.

Atualmente, o nematoide *C. elegans* é um dos principais invertebrados utilizados em sistemas modelo de infecção, incluindo investigações de virulência e patogênese por *Corynebacterium* spp. (Álibi *et al.*, 2021; Antunes *et al.*, 2015, 2016; Broadway *et al.*, 2013; Peixoto *et al.*, 2016; Ott *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015; Simpson-Louredo *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2019.). Os ensaios de *C. elegans* foram usados para distinguir entre *Corynebacterium durum* e *Corynebacterium glutamicum* inofensivos e cepas patogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* produtoras de toxina da difteria (DT) (Antunes *et al.*, 2016). *C. glutamicum* teve menor influência na mortalidade de *C. elegans*, enquanto a maioria dos nematóides infectados foram mortos por *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (Antunes *et al.* 2016).

Além disso, alterações morfológicas do nematoide *C. elegans* infectado, como agregados de vermes, denominados “star-worms” e inchaço retal (formação de *Dar*) também foram demonstrados pelas cepas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (Antunes *et al.*, 2015, 2016; Chen e Ton-That, 2020; Peixoto *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2015; Weerasekera *et al.*, 2019). Em um estudo anterior relatado, o comportamento de quimiotaxia, mortalidade e alterações morfológicas de nematóides *C. elegans* também foram verificados por cepas de *C. striatum* com diferentes perfis de MDR (Souza *et al.*, 2019).

Até onde sabemos, esta é a primeira investigação sobre o potencial de virulência de cepas clínicas nosocomiais representativas de *C. amycolatum* expressando perfis de MDR usando *C. elegans* como modelo de infecção animal. Os dados demonstraram patogenicidade para cepas MDR *C. amycolatum* isoladas de secreção vaginal, ferida cirúrgica e líquido de lavagem traqueal de pacientes com infecções hospitalares. *C. amycolatum* (134 cepas/secreção vaginal) causou um nível de mortalidade significativamente maior de nematóides desde o primeiro dia de infecção por *C. elegans*, e taxas de mortalidade de aproximadamente 70%, 7 dias pós-infecção.

Atualmente, foram verificadas alterações morfológicas (fenótipo *Dar* e worm bagging) e mortalidade em diferentes níveis de nematóides *C. elegans* infectados para cepas MDR *C. amycolatum* isoladas de infecções hospitalares. Os dados indicaram o potencial de virulência de *C. amycolatum* para nematóides *C. elegans*, de forma semelhante a estudos anteriores relatados com o patógeno nosocomial MDR *C. striatum* (Souza *et al.*, 2019). Portanto, como já demonstrado para *C. amycolatum* e *C. striatum*, ensaios de sobrevivência de nematóides podem indicar que *Corynebacterium* spp. expressa a capacidade de colonização do hospedeiro e morte de *C. elegans*, como demonstrado anteriormente para *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* produtores de DT.

A investigação de características de virulência é necessária, especialmente para prevenção e disseminação de cepas de *C. amycolatum* e *C. striatum* entre pacientes hospitalizados em todo o mundo, incluindo pacientes com câncer. O surgimento de cepas patogênicas de *Corynebacterium* MDR e a heterogeneidade de perfis de MDR, além do fato de que diferentes clones podem ser responsáveis por infecções hospitalares e/ou surtos é um problema preocupante (Carvalho *et al.* 2018, Souza *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2019). Curiosamente, a patogenicidade de *C. amycolatum* para *C. elegans* foi diretamente relacionada ao perfil de MDR, em concordância com dados previamente descritos para outros patógenos, incluindo *Klebsiella pneumoniae* (Bialek *et al.* 2010; Kamaladevi & Balamurugan, 2015; Yang *et al.*, 2020).

Os vermes adultos de *C. elegans* normalmente põem ovos que eclodem fora do corpo parental, mas a eclosão interna dos ovos, uma resposta adaptativa ao estresse chamada “worm bagging” tem sido relatada na literatura (Antunes *et al.* 2015, 2016; Mosser *et al.*, 2011;). Neste estudo, o fenômeno 'worm bagging' foi observado em nematóides *C. elegans* por todas as cepas *C. amycolatum* MDR testadas, o que confirmou o potencial de virulência das cepas de *Corynebacterium* não produtoras de TD testadas.

Além disso, alteração morfológica *Dar* e distensão abdominal foram observadas em diferentes intensidades para todas as cepas de *C. amycolatum* testadas. Em estudos anteriores, a eclosão interna de ovos (“worm bagging”) de nematóides *C. elegans* foi observada apenas durante o cultivo com cepas de *C. striatum*, e não com *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans*. Ao contrário de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, as taxas de mortalidade em vermes infectados correlacionaram-se com a eclosão interna de ovos (“worm bagging”) em *C. elegans* (Antunes *et al.* 2016; Souza *et al.*, 2019).

Os dados atuais sobre mortalidade e mudanças morfológicas em nematóides infectados por corinebactérias justificam uma investigação mais aprofundada sobre a natureza multifatorial do potencial de virulência de cepas de *C. amycolatum* e a influência das condições ambientais.

Os mecanismos de interação célula-patógeno do hospedeiro podem envolver uma série de fatores de virulência que facilitam sua fixação em superfícies mucosas e diferentes tipos de células, possivelmente disseminando-se para o sangue e/ou tecidos e causando doenças invasivas. A aderência bacteriana à mucosa respiratória e às estruturas das células epiteliais é importante não apenas para a persistência microbiana nas vias aéreas, mas também para sua disseminação sistêmica. O comportamento de internalização bacteriana dentro das células epiteliais fornece algumas informações sobre as estratégias de virulência de acordo com a cepa estudada, indicando que cada espécie desenvolve mecanismos especializados que agregam as funções normais das células hospedeiras e estimulam sua própria absorção e adaptação ao ambiente intracelular. Patógenos invasivos são frequentemente introduzidos nas células hospedeiras por endocitose. A vacuolização e degradação citoplasmática sugere a morte de células infectadas, o que poderia fornecer uma rota para a disseminação de microrganismos para locais distantes do foco infeccioso inicial, ou seja, focos de infecção metastática poderiam ser estabelecidos. Pesquisas anteriores de biologia molecular demonstraram a capacidade de patógenos bacterianos sobreviverem nos tecidos do hospedeiro e conferir resistência à eliminação por mecanismos imunes do hospedeiro e agentes antimicrobianos, incluindo *Corynebacterium* spp., como cepas *C. pseudodiphtheriticum* e *C. diphtheriae* (Hirata Jr *et al.*,

2004, 2008; Souza *et al.*, 2006). Portanto, a compreensão da biologia e o reconhecimento dos mecanismos de virulência podem ajudar a prevenir efetivamente infecções, especialmente casos variados nosocomiais causados por cepas *C. amycolatum* MDR. A aderência bacteriana aos macrófagos humanos (U-937) é relevante não apenas para a capacidade de infecção microbiana, sobrevivência, persistência nas vias aéreas e outros tecidos, mas também para disseminação hematogênica.

É bem conhecido que as interações entre bactérias e macrófagos ditam o resultado da maioria das doenças infecciosas. Os macrófagos são capazes de se ligar e internalizar uma bactéria. Assumindo que a maioria das bactérias é morta rapidamente pelos macrófagos, podemos concluir que os ensaios bactericidas são os melhores quando medidos dentro de algumas horas após a co-incubação de células e bactérias. Pois, os receptores que um macrófago usa para internalizar células bacterianas podem influenciar o destino intracelular do organismo (Santos *et al.*, 2010; Zychlinsky & Sansonetti, 1997). Nesta perspectiva, nossos resultados mostraram que os macrófagos U-937 podem ser heterogêneos quanto à sua capacidade de matar *C. amycolatum*. Estudos adicionais são necessários para investigar o tipo de receptores de membrana envolvidos neste processo.

Neste estudo, quatro amostras de *C. accolens* foram isoladas de lavados broncoalveolares. As colônias desse microrganismo eram pequenas, cinzentas, transparentes e não hemolíticas. O crescimento foi potencializado por lipídios como Tween 80. De acordo com a literatura, *C. accolens* é um bacilo Gram-positivo considerado habitante do trato respiratório superior. Este microrganismo foi isolado de espécimes clínicos humanos de diversos locais, incluindo secreção de feridas, escarro, swab de garganta, abscesso mamário e válvula cardíaca. Também foi isolado de casos de sepse, otite média, ceratoconjuntivite, sinusite maxilar e meningite. Esforços rigorosos para confirmar a identificação deste microrganismo fatidioso são importantes, sobretudo quando esta bactéria é isolada de locais atípicos (Wong *et al.*, 2010).

O teste de suscetibilidade antimicrobiana permanece raramente realizado em *Corynebacterium* spp. em muitos laboratórios. O método de suscetibilidade por disco-difusão é amplamente utilizado por laboratórios de microbiologia no Brasil e em outros países. Além disso, as diretrizes do CLSI não fornecem pontos de corte para difusão em disco, enquanto o documento EUCAST fornece pontos de interrupção para testes de suscetibilidade de corinebactérias apenas para alguns antibióticos, excluindo várias classes importantes de antimicrobianos, por isso muitos pesquisadores costumam usar pontos de interrupção de *Staphylococcus* (Alibi *et al.*, 2017; Baio *et al.*, 2013; Olender *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2019). O antibiograma pode evitar a exposição a múltiplos antibióticos e, conseqüentemente, reduzir

a permanência hospitalar. A pressão seletiva exercida por tratamentos antimicrobianos anteriores pode favorecer o crescimento excessivo de *Corynebacterium* spp. MDR como colonizador secundário em hospedeiros imunocomprometidos (Qin *et al.*, 2017). Neste estudo, todas as amostras analisadas foram sensíveis à vancomicina, gentamicina, tetraciclina e rifampicina. Também foi isolada amostra de *C. accolens* com perfil multirresistente.

C. accolens é um microrganismo pouco citado na literatura. Ang & Brown (2007), relataram o perfil resistente à penicilina G e sensível à vancomicina, para *C. accolens* isolado de abscesso mamário. Nhan *et al.* (2012) relataram *C. accolens* de espécimes clínicos respiratórios suscetíveis a vancomicina, gentamicina, linezolida, amoxicilina e imepenem. No entanto, todas as amostras foram resistentes à eritromicina e com alta porcentagem de resistência às cefalosporinas de terceira geração. Nossos achados enfatizam que *C. accolens* apresentou diferentes perfis de resistência. As cepas 59T e 173 foram sensíveis aos 14 antimicrobianos testados, enquanto a cepa 29 apresentou perfil resistente a penicilinas e macrolídeos e a cepa 80 apresentou perfil MDR. Muitos trabalhos mencionaram que continua sendo uma prioridade identificar *Corynebacterium* spp. no nível de espécie em laboratórios (Qin *et al.*, 2017). Assim, é necessário a correta identificação destes microrganismos e a vigilância contínua de seus padrões de resistência aos antimicrobianos.

Corynebacterium spp. têm sido cada vez mais reconhecidas como causas de infecções humanas significativas (Qin *et al.*, 2017). Muitas infecções causadas por *Corynebacterim* spp. permanecem sem diagnóstico. Geralmente, essas espécies crescem mais lentamente em meios de cultura usuais, ou podem ser classificadas incorretamente. O possível envolvimento desses microrganismos em infecções nosocomiais não deve ser subestimado, conferindo seu padrão multirresistente aos antibióticos frequentemente utilizados (Dragomirescu *et al.*, 2020).

Sobre a resistência às fluoroquinolonas, deve-se destacar *C. accolens* (cepa 80). Estas estirpes não são sensíveis à ciprofloxacina. De acordo com a literatura, as sequências que codificam a subunidade A da enzima girase em *C. amycolatum* mostraram que a resistência às fluoroquinolonas está associada a mutações de natureza espontânea neste gene e depende do número de mutações e do tipo de aminoácido que foi substituído (Ramos *et al.*, 2019; Sierra *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2011).

C. elegans tem sido utilizado como hospedeiro alternativo para o estudo de fatores de virulência bacterianos necessários à patogênese em sistemas mamíferos, apesar da distância evolutiva e diferenças nas temperaturas de crescimento entre mamíferos (37°C) e nematóides (20°C) (Sifri *et al.* 2003; Souza *et al.*, 2019). Nesta perspectiva, verificou-se o potencial de virulência de *C. amycolatum*, *C. falsenii*, *C. minutissimum* e *C. accolens*, patógenos

oportunistas humanos que crescem a 37°C, à temperatura de crescimento do nematoide (20°C). De acordo com a literatura atual, esta é a primeira vez que este ensaio é realizado para essas espécies de corinebactérias.

No presente estudo, os resultados mostraram que os ensaios de sobrevivência do nematoide indicaram que cepas de *Corynebacterium* spp. expressaram uma alta capacidade de colonização do hospedeiro e morte de *C. elegans*, como demonstrado anteriormente para a cepa toxigênica *C. diphtheriae* CDC-E8392 (Antunes *et al.*, 2015, 2016; Peixoto *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2015;). Curiosamente, a cepa 173 - *C. accolens*, suscetível a todos os antibióticos testados, foi mais nociva para *C. elegans* em comparação com as demais cepas testadas, incluindo amostras MDR. Assim, a patogenicidade de *Corynebacterium* spp. para *C. elegans* não se relacionou diretamente com o perfil de MDR.

O fenômeno “worm bagging”, foi relatado como induzido em alta frequência pela exposição a bactérias patogênicas. Esse fenômeno foi observado em cepas virulentas de *E. coli* e ensaios de *Enterococcus faecalis*, e pode ser considerado um relator de estresse confiável em toda a população (Antunes *et al.*, 2015, 2016; Mosser *et al.*, 2011;). Esse achado sugeriu uma resposta adaptativa, pois o corpo parental poderia fornecer alimento e proteção física suficientes para as pequenas larvas nessa condição (Chen & Caswell-Chen, 2003). Neste estudo, podemos observar esse fenômeno em todas as cepas de *Corynebacterium* spp. testadas, o que reafirma o potencial de virulência destas cepas.

Culturas de *C. elegans* foram avaliadas quanto à presença de um fenótipo de abdome inchado ou região anal deformada (*Dar*), que é a resposta morfológica de alguns nematóides rhabditídeos à infecção retal. Essa resposta foi verificada em espécime laboratorial infectado por uma bactéria corineforme, que foi isolada repetidamente em laboratórios de nematóides, mas nunca da natureza (Akimkina *et al.*, 2006; Hodgkin *et al.*, 2013). A alteração morfológica *Dar* e distensão abdominal foram observadas em diferentes intensidades em todas as cepas corineformes que testamos.

C. elegans foi usado anteriormente para investigar espécies de corinebactérias inofensivas e prejudiciais. *C. glutamicum* teve influência significativa, mas menor, na sobrevivência de *C. elegans*. Por outro lado, *C. elegans* foram mortos por infecção com *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*. Na temperatura de crescimento do nematoide (20°C), a mortalidade de *C. elegans* foi observada em taxas de aproximadamente 20%, 70% e 90% 5 dias após a infecção com as cepas *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, respectivamente (Antunes *et al.* 2016; Souza *et al.*, 2019). Neste estudo, observamos diferenças nos níveis de patogenicidade de acordo com a espécie de *Corynebacterium* testada. *C. amycolatum* (amostra

134) foi o mais patogênico, pois podemos observar diferença na sobrevivência no primeiro dia do teste, e a mortalidade de *C. elegans* foi observada em taxas de aproximadamente 70% após 7 dias do ensaio de infecção. *C. accolens* (amostras 173) demonstrou capacidade de matar todos os nematóides em 7 dias de ensaio, e *C. falsenii* (amostra 275) uma taxa de mortalidade de aproximadamente 60% de *C. elegans* no mesmo período e condições de ensaio. Assim, os resultados mostraram que *Corynebacterium* spp. possui potencial de virulência para *C. elegans*.

A respeito das técnicas de diagnóstico bacteriano, a técnica de MALDI-TOF MS tem comprovada precisão para a identificação rápida de corinebactérias, toxinogênicas ou não (Konrad *et al.*, 2010; Bizzini *et al.*, 2011; Alatoon *et al.*, 2012; Gomila *et al.*, 2012; Verroken *et al.*, 2013). A associação de métodos fenotípicos tradicionais, morfológicos e bioquímicos, somados a metodologia de MALDI-TOF, permitiu a identificação de todas as amostras estudadas, tanto ao nível de gênero, como ao nível de espécie.

O fabricante Bruker Daltonics informa que espécies do gênero *Corynebacterium* possuem padrões muito similares. Portanto, de acordo com o fabricante, distinguir espécies deste gênero é uma tarefa difícil. Por isso, recomenda-se um score superior a 2.000 para a identificação da espécie e um score entre 1.700 a 1.999 para o gênero. Apesar disso, Alatoon *et al.* (2011), validaram o score acima de 1.700 como ponto de corte seguro para a identificação de espécies de *Corynebacterium*. A mesma abordagem também foi validada por Bizzini *et al.* (2011) para membros deste gênero. Alatoon *et al.* (2011) também sugere que um score abaixo do indicado pelo fabricante possa ser adequado para a identificação de corinebactérias ao nível de gênero, uma vez que embora o número de isolados com scores entre 1.600 e 1.699 tenha sido baixo em seu estudo, todos os isolados com o score mencionado foram corretamente identificados. Embora o fabricante cite a dificuldade do equipamento em discriminar espécies do gênero *Corynebacterium*, todas as estirpes analisadas neste estudo apresentaram score superior a 2.000. Além disso, os resultados dos trabalhos de Alatoon *et al.* (2011), Bizzini *et al.* (2011) e Konrad *et al.* (2010) apontam que a técnica de MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) seja uma abordagem confiável para a identificação segura deste grupo de microrganismos, inclusive quando um score abaixo de 2.000 é obtido.

Além do MALDI-TOF, a identificação das cepas MDR de *C. amycolatum* (cepas 28 e 134) foi confirmada pelo sequenciamento do gene conservado 16S rRNA. Em concordância com Gomila *et al.* 2012, que confirmaram a identificação de diferentes espécies de *Corynebacterium* através destas técnicas, caracterizando-as como eficazes. Desse modo, a utilização do gene 16S rRNA para fins de identificação tem sido ampla, uma vez que este gene é universal para bactérias e uma grande quantidade de sequências deste gene está disponível

em banco de dados de sequências de nucleotídeos, permitindo assim a comparação das sequências de estirpes bacterianas desconhecidas. As sequências do gene 16S rRNA, assim como do *bla* gene, das amostras 28 e 134 foram depositadas no GenBank, acesso OP001419 e OP001418, e encontram-se disponíveis para consulta pública. Desta forma, podemos afirmar que o teste fenotípico para detecção de MBL em amostras de *C. amycolatum*, pelo método de disco aproximação foi eficaz e o resultado confirmado através de ferramenta molecular.

CONCLUSÃO

As análises dos resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- a) O MALDI-TOF-MS é uma técnica de diagnóstico rápida, econômica e confiável para a identificação de *Corynebacterium* spp.
- b) Os microrganismos estudados apresentaram diferentes perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Corinebactérias com fenótipo multirresistente foram detectadas. Metade das cepas multirresistentes apresentou fenótipo MBL positivo. *C. amycolatum* foi a espécie prevalente quanto ao fenótipo de multirresistência, incluindo o fenótipo MBL positivo.
- c) O estudo destaca a relevância de *C. amycolatum* e *C. accolens* como patógenos nosocomiais MDR. As cepas de *C. amycolatum* resistentes à penicilina foram positivas para o gene *bla*, codificando uma beta-lactamase classe A. De acordo com o conhecimento atual, esta é a primeira identificação de *C. amycolatum* imipenem não-suscetível. Assim, sugerimos que os programas de vigilância médica incluam estratégias de controle para diminuir potenciais fatores de risco de infecções hospitalares por *Corynebacterium* spp.
- d) As análises resultantes do sequenciamento do gene 16S rRNA corroboram para a identificação dos isolados clínicos deste trabalho para a espécie *C. amycolatum*. Da mesma forma, as análises resultantes do sequenciamento do gene *bla* demonstraram identidades e coberturas deste gene em diferentes espécies do gênero *Corynebacterium*, incluindo a espécie *C. amycolatum*.
- e) Todas as amostras de *Corynebacterium* spp. testadas foram capturadas pelos macrófagos. No ensaio *in vitro* foi observado o predomínio de macrófagos com núcleo picnótico, fato sugestivo de sofrimento celular. Em termos gerais as amostras de *C. amycolatum* (amostras 28, 59B, 134) e *C. falseni* (amostra 275) apresentaram maior percentual de bactérias aderidas as monocamadas de macrófagos U-937 quando comparada as amostras de *C. accolens*, o que sugere maior potencial de virulência destas cepas. Entretanto, maiores investigações são necessárias e continuaremos trabalhando nisto.
- f) Foi verificada a capacidade de *C. amycolatum* e de *C. accolens* em matar o nematódeo *C. elegans*. A interação do nematódeo e *Corynebacterium* não-diftérico (CND) resultou em alterações morfológicas em *C. elegans*, o que pode fornecer

novos *insights* sobre aspectos da patogenicidade bacteriana e mecanismos subjacentes aos processos fisiológicos humanos. Esta interação merece maior investigação e continuaremos este trabalho sobre a patogênese de CND e a resposta imune do hospedeiro.

- g) Os profissionais de saúde devem permanecer atentos à possibilidade de processos infecciosos ocasionados por corinebactérias em diferentes sítios e no ambiente hospitalar, sobretudo amostras multirresistentes aos antimicrobianos comumente empregados na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- ADDERSON E.E, BOUDREAUX J.W, HAYDEN R.T. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Ped Infect Dis Journal*, v. 27, p. 136-141, 2008.
- AHMAD N.M, AHMAD, K. M. *Corynebacterium minutissimum* pyelonephritis with associated bacteraemia: a case report and review of literature. *Journal of Infection*, v. 51, n. 5, p. 299-303, 2005.
- AKIMKINA, T., YOOK, K., CURNOCK, S., & HODGKIN, J. (2006). Genome characterization, analysis of virulence and transformation of *Microbacterium nematophilum*, a coryneform pathogen of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *FEMS microbiology letters*, v. 264, n. 2, 145-151.
- ALATOOM AA, CAZANAVE CJ, CUNNINGHAM SA, IHDE SM, PATEL R. Identification of Non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, v. 50, p. 160–163, 2012.
- ALIBI S., FERJANI A., BOUKADIDA J., CANO M.E., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ M., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. & NAVAS, J. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports* v. 7, p. 9704, 2017.
- ANG MNL & BROWN H. *Corynebacterium accolens* isolated from breast abscess: possible association with granulomatous mastitis. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, n. 5, p. 1666-1668, 2007.
- ANTUNES CA. *et al.* Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiol.*, v.162, n. 3, p. 639-647, 2015.
- ANTUNES CA, CLARK L, WANUSKE MT, HACKER E, OTT L, SIMPSON-LOUREDO L, DE LUNA MD, HIRATA R JR, MATTOS-GUARALDI AL, HODGKIN J, BURKOVSKI A3. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria. *Microbiology.*, v 162, n. 1, 84-93, 2016.
- ANTUNES C. A. *et al.* Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiol.*, v.162, n. 3, p. 639-647, 2015.
- ARAGÃO, A *et al.* Proteins from the core genome of *Corynebacterium ulcerans* respond for pathogenicity and reveal promising vaccine targets for diphtheria. *Microbial Pathogenesis*, v. 161, p. 105263, 2021.
- ARAKAWA, Y. *et al.* Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiolcompounds. *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 1, p. 40-3, 2000.
- BADELL, E., HENNART, M., RODRIGUES, C., PASSET, V., DAZAS, M., PANUNZI, L., ... & BRISSE, S. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Research in Microbiology*, 2020.

BAIO, PV. Clonal multidrug resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 23–29, 2013.

BAIRD, GJ.; FONTAINE, MC. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J Comp Pathol*, v. 137, p. 179-21, 2007.

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.

BELMARES J, DETIERLINE S, PAK JB, PARADA JP. *Corynebacterium* endocarditis, the species specific risk factors and the outcome. *BMC Infect Dis*, v. 7, p. 4-8, 2007.

BERNARD, K. The Genus *Corynebacterium* and other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, p. 3152-3158, 2012.

BERNARD KA, MUNRO C, WIEBE D, ONGSANSOY E. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 4375-4381, 2002.

BERTUCCINI, L, BALDASSARRI, L, VON HUNOLSTEIN, C. Internalization of non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microbial pathogenesis*, v. 37, n.3, p. 111-118, 2004.

BIBERSTEIN, EL.& ZEE, YC. *Tratado de microbiologia veterinaria*. Zaragoza: Acriba.; 157-161,1994.

BIERNE, H et al. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Molecular microbiology*, v. 43, n. 4, p. 869-881, 2002.

BIZZINI A, JATON K, ROMO D, BILLE J, PROD'HOM G, GREUB G. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol*, v.49, p.693–696, 2011.

BITRAGUNTA, S. *et al.* Safety and immunogenicity of single dose of tetanus–diphtheria (Td) vaccine among non/partially immune children against diphtheria and/or tetanus, Hyderabad, India, 2007. *Vaccine*, v. 28, p. 5934-5938, 2010.

BISHAI, W. R. ; MURPHY J.R. Diphtheria others infections caused by *Corynebacteria* and related species. In : AS Fauci, E Braunwald, DL Kasper et al. Eds., *Harrison's Principles of International Medicine.*, v 1. McGraw-Hill, New York, 890-895.

BONMARIN, I. et al. Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*, v. 27, n. 31, p. 4196-4200, 2009.

BORDE, K et al. Not always a commensal: A case of mastitis by *Corynebacterium amycolatum*. *IDCases*, v. 20, p. e00728, 2020.

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

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p.71-94, 1974.

BROADWAY, M. M. et al. Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 16, p. 3774-3783, 2013.

BYRAM A, EKSI F, BALCI I. Resistance problem of coryneform bacteria isolated from intensive care unit samples. *Res J Microbiol*, v. 1, p. 136-141, 2006.

CAMELLO, TCF, MATTOS-GUARALDI, AL, FORMIGA, LCD, MARQUES, EAM. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 1-4, 2003.

CAMELLO, TCF et al. "*Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries." *Letters in applied microbiology*, v. 48, n. 4, p. 458-464, 2009.

CAMPANILE F, CARRETTO E, BARBARINI D, GRIGIS A, FALCONE M, GOGGIO A, ET AL. Clonal Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg Infect Dis*, v. 15, p.75-7, 2009.

CARVALHO RVD, LIMA FFDS, SANTOS CSD, SOUZA MCD, SILVA RSD, MATTOS-GUARALDI ALD. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 22, p. 347-351, 2018.

CATTANI, S. et al. Sepsis caused by *Corynebacterium xerosis* in neonatology: report of a clinical case. *Acta Biomedica Ateneo Parmense*, v. 71, p. 777-780, 2000.

CAVENDISH, J.; COLE, J. B; OHL, CA. Polymicrobial central venous catheter sepsis involving a multiantibiotic-resistant strain of *Corynebacterium minutissimum*. *Clinical Infectious Disease*, v. 19, n. 1, p. 204-205, 1994.

CHANDRAN R, PUTHUKKICAL DR, SUMAN E, MANGALORE SK. Diphtheroids-Important Nosocomial Pathogens. *J Clin Diagn Res*, v. 10, n. 12, p. 28-31, 2016.

CHEN YW, TON-THAT H. *Corynebacterium diphtheriae* virulence analyses using a *Caenorhabditis elegans* model. *Current protocols in microbiology*, v. 58, n. 1, p. 109, 2020.

CHEN, C et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 for L-valine production. *Metabolic engineering*, v. 29, p. 66-75, 2015.

CHEN, J., & CASWELL-CHEN, E. Why *Caenorhabditis elegans* adults sacrifice their bodies to progeny. *Nematology*, 5(4), 641-645, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests: Approved Standard*, 2021.

COLOMBO, A. V. et al. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 197, n. 2, p. 235-239, 2001.

COYLE, MB, LIPSKY, B A. Coryneform Bacteria in Infectious Diseases: clinical and laboratory aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, p.227-246, 1990.

DANGEL, A., BERGER, A., KONRAD, R., & SING, A. NGS-based phylogeny of diphtheria-related pathogenicity factors in different *Corynebacterium* spp. implies species-specific virulence transmission. *BMC microbiology*, v. 19, n. 1, p. 28, 2019.

DE ZOYSA, A.; EFSTRATIOU A.; HAWKEY, P. M. Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (dtxR) genes present in nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 223-228, 2005.

DIAS, A. A., SILVA, F. C., PEREIRA, G. A., SOUZA, M. C., CAMELLO, T. C., DAMASCENO, J. A., ... & MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 8, p. 743-748, 2010.

DIAS, M, SHREEVIDYA, K, RAO, S, SHET, D. *Corynebacterium macginleyi* a rare bacteria causing infection in an immunocompromised patient, *J. Cancer Res. Ther.*, v. 6, n. 3, p. 374-375, 2011.

DINLEYICI, EC, YARGIC ZA, BOR O, KIREMITCI A, DURMAZ G. "Tigecycline treatment of multi-drug-resistant *Corynebacterium jeikeium* infection in a child with relapsing and refractory acute lymphoblastic leukemia." *Pediatric blood & cancer*, v. 55, n. 2, p. 349-351, 2010.

ESTEBAN, J. et al. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 18, p. 518-521, 1999.

FERNANDES AT, RIBEIRO NF. Infecção do Acesso Vascular. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro N.F, organizadores. *Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde*. São Paulo (SP): Atheneu; 2000. p.556-79.

FERNANDEZ-GARAYZABAL JFR, EGIDO AI, VELA, V, BRIONES MD, COLLINS A, MATEOS R A, HUTSON L, DOMINGUEZ J. Isolation of *Corynebacterium falsenii* and description of *Corynebacterium aquilae* sp. nov., from eagles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 53, p.1135-1138, 2003.

FERNANDEZ-GARAYZABAL JFR, VELA V, EGIDO AI, HUTSON RA, LANZAROT MP, FERNANDEZ-GARCIA M, COLLINS, A. *Corynebacterium ciconiae* sp. nov., isolated from the trachea of black storks (*Ciconia nigra*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 54, p. 2191-2195, 2004.

FERNANDEZ-NATAL MI, JA SAEZ-NIETO, S VALDEZATE, RH RODRIGUEZ-POLLAN, S LAPENA, F CACHON AND F SORIANO. Isolation of *Corynebacterium ureiceleriovorans* from normally sterile sites in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; v. 28, p. 677-681, 2008.

FERREIRA, D. W., CHEN, Y., & ALLARD, P. Using the alternative model *C. elegans* in reproductive and developmental toxicology studies. In *Developmental and Reproductive Toxicology* (pp. 261-278). *Humana Press*, New York, NY, 2014.

FEURER, C, CLERMONT, D, BIMET, F, CANDREA, A, JACKSON, M, GLASER, P, DAUGA, C. Taxonomic characterization of nine strains isolated from clinical and environmental specimens, and proposal of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 54, n.4, p. 1055-1061, 2004.

FINLAY, BB. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 2, p. 815-820, 1990.

FILARDY AA. Padrão agregativo de aderência a células HEp-2 de amostras toxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de processos infecciosos invasivos [*Dissertação de Mestrado*]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2005.

FORMIGA, LCD, MATTOS-GUARALDI, AL. Difteria: profissionais susceptíveis, diagnóstico, vacinação e reparação de danos. *J Bras Pat*, v. 37, n. 4, p. 292-293, 2001.

FRANÇA FL, WELLS TJ, BROWNING DF, NOGUEIRA RT, SARGES FS, PEREIRA AC, CUNNINGHAM AF, LUCHEZE K, ROSA ACP, HENDERSON IR, DE LUNA MDG. Genotypic and phenotypic characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. *PloS one*, v. 8, n. 7, p. 69-71, 2013.

FUNKE, G., & BERNARD, K. A. Coryneform Gram-positive rods. *Manual of clinical microbiology*, p. 413-442, 2011.

FUNKE, G., LAWSON, P. A. & COLLINS, M. D. *Corynebacterium mucifaciens* sp. nov., an unusual species from human clinical material. *Int J Syst Bacteriol*, v. 47, p. 952-957, 1997.

Funke G, Renaud FN, Freney J, Riegel P. Multicenter Evaluation of the Updated and Extend API (RAPID) CORYNE Database 2.0. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p.3122-3126, 1997.

FUNKE, G., FRODL, R., BERNARD, K. A., & ENGLERT, R. *Corynebacterium freiburgense* sp. nov., isolated from a wound obtained from a dog bite. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 59, n. 8, p. 2054-2057, 2007.

GALAZKA, A. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. *J. Infect. Dis.*, v. 181, n.1, p.S2-9, 2000.

GALAZKA, AM, ROBERTSON, SE. Diphtheria: changing patterns in the developing world and the industrialized world. *Eur J Epidemiol*, v. 11, p. 107-117, 1995.

GALES AC, MENEZES LC, SILBERT S, SADER HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-b-lactamase. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 699-702, 2003.

GARDENIER JC, SAWYER RG, SIFRI CD, BRAYMAN K, WISPELWAY B, BONATTI H. Peritonitis caused by *Haemophilus parainfluenzae*, *Leifsonia aquatica*, and *Gordonia* spp. in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Surgical Infections*, v. 13, p. 409-412, 2012.

GARNER JS, JARVIS WR, EMORI TG, HORAN TC, HUGHES JH. CDC definitions for nosocomial infections. *Am. J. Infect Control*, v. 16, p. 128-40, 1998.

GASPAR AH, TON-THAT H. Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol.*, v 188, p. 1526-1533, 2006.

GHOSH, P, MANGAL, KK, SHARMA, YK, MISRA, RN, DASH, KN. Co-Infection of Herpes Genitalis with *Corynebacterium amycolatium*: A Rare Case Report from the District of Western Maharashtra, India. *J Clin Diagn Res*, v. 4, p.1-3, 2012.

GODET C, BERAUD G, CADRANEL J. Bacterial pneumonia in HIV-infected patients (excluding mycobacterial infection). *Revue Maladies Respiratoires*, v. 29, p. 1058-66, 2012.

GOMES, DLR. Participação de carboidratos de superfície de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* na hemaglutinação. [*Dissertação (Mestrado em Microbiologia)*], Faculdade de Ciência Médica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

GOMES, D. L. et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J. Med. Microbiol.*, v. 58, n.11, p. 1419-27, 2009.

GOMILA M, RENOM F, GALLEGOS MDC *et al.* Identification and diversity of multi-resistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by mutigene sequencing approach. *BMC Microbiol*, v. 12, p. 52–60, 2012.

GHOSH, P, MANGAL, KK, SHARMA, YK, MISRA, RN, DASH, KN. Co-Infection of Herpes Genitalis with *Corynebacterium amycolatium*: A Rare Case Report from the District of Western Maharashtra, India. *J Clin Diagn Res.*, v. 4, p. 1-3, 2012.

GROVES, John B.; NASSEREDDIN, Ali; FREEMAN, Andrew M. Erythrasma. In: *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, 2021.

GUIMARÃES, A.L. et al. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Vet Res*, v. 7, p. 68, 2011.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press*, New York, NY, USA, 1999.

HATANAKA, A. et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. *Emerg Infect Dis*. v. 9, p. 752-753, 2003.

HATTORI T, PACK M, BOUGNOUX P, CHANG ZL, HOFFMAN T. Interferon-induced Differentiation of U-937 Cells. *The Journal of Clinical Investigation.*, v. 72, p. 237-244, 1983.

HIRATA JR, R. *et al.* Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 24, p. 115-119, 2002.

HIRATA JR R, SOUZA SMS, ROCHA-DE-SOUZA CM, ANDRADE AFB, MONTEIRO-LEAL LH, FORMIGA LCD & MATTOS-GUARALDI AL. 2004. Patterns of adherence to Hep-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microb. Pathog.*, v. 36, p. 125-130, 2004.

HIRATA JR, R, PEREIRA, GA., FILARDY, AA., GOMES, DLR, DAMASCO, PV, ROSA, ACDP, MATTOS-GUARALDI, AL. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, n.11, p. 986-991, 2008.

HOCAOGLU, M *et al.* Maternal ventriculoperitoneal shunt infection due to *Corynebacterium xerosis* following caesarean section. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 39, n. 3, p. 400-402, 2019.

HOEFER, A *et al.* Molecular and epidemiological characterization of toxigenic and nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium rouxii*, and *Corynebacterium ulcerans* isolates identified in Spain from 2014 to 2019. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 59, n. 3, p. e02410-20, 2021.

HÖFLER, W. Cutaneous diphtheria. *Int. J. Dermatol.*, v. 30, n. 12, p. 845-847, 1991.

HOLMES, R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *J. Infect. Dis.*, v.181, n. S1, p. S156-167, 2000.

INWEREGBU, KEN, JAYSHREE DAVE, AND ALISON PITTARD. "Nosocomial infections." Continuing Education in Anaesthesia, *Critical Care & Pain*, v.5, n.1, p.14-17, 2005.

IWAKI, M. *et al.* Genome organization and pathogenicity of *Corynebacterium diphtheria* C7(β) and PW8 strains. *Infect. Immun.*, v. 78, p. 3791-3800, 2010.

JACQUES M, ROY G, MITTAL KR. Hemagglutinating properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Microbiol.*, v. 34, p. 1046-1049, 1988 .

KALINOWSKY J BATHE B, BARTELS D, BISCHOFF N, BOTT M, BURKOVSKY A, *et al.* The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol*, v.104, p.5-25, 2003.

KANG HJ, PATERSON NG, GASPAR AH, TON-THAT H, BAKER EN. The *Corynebacterium diphtheriae* shaft pilin SpaA is built of tandem Ig-like modules with stabilizing isopeptide and disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 106, p. 16967-16971, 2009.

KARUNAKARAN R. *et al.* *Tsukamurella tyrosinosolvans* intravascular catheter-related bacteremia in a haematology patient: a case report. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 15, p.1343-1346, 2011.

KAWASAKI, YU, *et al.* "*Corynebacterium propinquum* as the first cause of infective endocarditis in childhood." *Journal of Infection and Chemotherapy.*, v. 20, n. 5, p. 317-319, 2014.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *Corynebacterium* species rpoB gene sequencing for identification. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 9, p. 3925–3931, 2004.

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

KHARSEEVA, G. G., & VORONINA, N. A. Pathogenicity factors of *Corynebacterium non diphtheriae*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii*, v. 3, p. 97-104, 2016.

KIRBY-BAUER, A. W. Kirby Bauer method antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

KLINE, K.A.; LEWIS, A.L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 2, 2016.

HONG DJ, BAE IK, JANG IH, JEONG SH, KANG HK, LEE K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*. 2015.

KAMALADEVI, A., & BALAMURUGAN, K. Role of PMK-1/p38 MAPK defense in *Caenorhabditis elegans* against *Klebsiella pneumoniae* infection during host–pathogen interaction. *Pathogens and Disease*, v. 73, n. 5, p. 21, 2015.

KONEMAN EW, ALLEN S.D., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER P.C., WASHINGTON JR C.W. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Ravens Publishers, 2008.

KONRAD R, BERGER A, HUBER I *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro Surveill*, v. 15, p. 196-199, 2010.

KOSTYUKOVA NN, PEREVERZEV NA. Adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, v. 11, p. 30-33, 1985.

KNOX, K. L., & HOLMES, A. H. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerging infectious diseases*, v.8, n.1, p.97-99, 2002.

KURIA, J.K.N., MBUTHIA, P.G., KANG'ETHE, E.K., WAHOME, R.G. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet. Res. Commun.*, v. 25, p. 89–97, 2001.

LAGROU K, VERHAEGEN J, JANSSENS M, WAUTERS G, VERBIST L. A prospective study on catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: their identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibilities. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 30, p. 7-15, 1998.

LARRICK JW, FISCHER DG, ANDERSON SJ, KOREN HS. Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated in vitro: a model of macrophage functions. *J Immunol*, v. 125, n. 1, p. 6-12, 1980.

LAXMINARAYAN, RAMANAN, AND DAVID L. HEYMANN. "Challenges of drug resistance in the developing world." *Bmj*, p. 344, 2012.

LEAL, S. M., JONES, M., & GILLIGAN, P. H. Clinical significance of commensal gram-positive rods routinely isolated from patient samples. *Journal of clinical microbiology*, v. 54, n. 12, p. 2928-2936, 2016.

LEE, K. *et al.* Metallo- β -lactamase-producing Gramnegative bacilli in Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP-producing *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 50, p. 51-8, 2004.

MANDLIK, A. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, v. 64, n. 1, p. 111-124, 2007.

MANDLIK, A. *et al.* Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 33-40, 2008.

MANZELLA JP, KELLOGG JA, PARSEY KS. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. *Clin Infect Dis*, v. 20, p.37–40, 1995.

Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 70, p. 192-221, 2006.

MARTIN MC, MELON O, CELADA MM, ALVAREZ J, MENDEZ FJ, VAZQUEZ F. Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. *J Med Microbiol*, v. 52, p.599–602, 2003.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ORTEGA, M. C.; SUÁREZ, A. I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 1318-21, 1995.

MARTI, J.; ANTON, E.; IDOATE, A. Implantable cardioverter-defibrillator infection due to *Corynebacterium xerosis*. *International Journal of Cardiology*, v. 128, n. 1, p. e1-2, 2008.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ORTEGA, M. C.; SUÁREZ, A. I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 1318-21, 1995.

MARTINS, CAS. Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de processos infecciosos causados por *Corynebacterium* spp em pacientes de centro de referência oncológico. [Tese (Doutorado em Ciências Médicas)] Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 2014.

MARTINS, C. A. S. et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Brazil, v. 104, n. 6, p. 905-913, 2009.

MARULL, J.; CASARES, PA. Nosocomial valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: a case report. *Cases Journal*, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2008.

MATTOS-GUARALDI AL & FORMIGA LCD. Bacterial properties of a sucrosefermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr. Microbiol.*, v. 37, p. 156-158, 1998.

MATTOS-GUARALDI, AL *et al.* Diphtheria remains a threat to health in the developing world - an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 987-93, 2003.

MATTOS-GUARALDI AL, FORMIGA LCD, PEREIRA GA. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes Infect*, v. 2, p. 1507-12, 2000.

MATTOS-GUARALDI, AL *ET al.* Diphtheria in vaccinated adult in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 32, n. 2, p. 236-239, 2001.

MATTOS-GUARALDI AL & FORMIGA LCD. Hemagglutination pattern of *Corynebacterium diphtheriae*. *Rev Microbiol.*, v. 23, p. 8-12, 1992.

MATTOS-GUARALDI, AL, HIRATA JR, R, DAMASCO, PV. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos sobre o cenário atual. *Rev Ass Bras Imun*, v. 1, p. 1-19, 2011.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L.C.D. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 24, n.4, p. 399-406, 1991.

MELEWICZ FM, KLINE LE, COHEN AB, SPIEGELBERG HL. Characterization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol.*, v. 49, n. 2, p. 364-70, 1982.

MENBERU, MA *et al.* *Corynebacterium accolens* has antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* pathogens isolated from the sinonasal niche of chronic rhinosinusitis patients. *Pathogens*, v. 10, n. 2, p. 207, 2021.

MEYER DK, REBOLI AC. Other coryneform bacteria and *Rhodococci*. En: *Mandell GL, Bennett JE, Dolim R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 7ª. ed.* Filadelfia: Churchill Livingstone; p. 2695-706, 2010.

MILOSAVLJEVIC, MN, MILOSAVLJEVIC, JZ, KOCOVIĆ, AG., STEFANOVIĆ, SM., JANKOVIĆ, SM., DJESEVIĆ, M., & MILENTIJEVIĆ, MN. Antimicrobial treatment of *Corynebacterium striatum* invasive infections: a systematic review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, p. 63, 2021.

MOHAMED SW, MOHAMED NA, YOUSIF D, FAHAL AH. Tongue actinomycetoma due to *Actinomadura madurae*: a rare clinical presentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 70, p. 622-624, 2012.

MOLINARI, G, CHHATWAL, GS. Streptococcal invasion. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 56–61, 1999.

MORAES, G et al. Homology modeling, molecular dynamics and QM/MM study of the regulatory protein PhoP from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of molecular modeling*, v. 18, n. 3, p. 1219-1227, 2012.

MORTIMER, EA, WHARTON, M. *Diphtheria toxoid*. In SA Plotkin, WA Orenstein, eds. Vaccines. USA: Ed. WB Saunders, p.140-157, 1999.

MOSSER, T., MATIĆ, I., & LEROY, M. Bacterium-induced internal egg hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 22, p. 8189-8192, 2011.

MURRAY, P, ROSENTHAL, K; PFALLER, MA. *Microbiologia medica* 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NATHAN C, SHILOH M. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, p. 8841-8, 2000.

NEEMUCHWALA, A et al. In vitro antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 62, n. 4, p. e01776-17, 2018.

NHAN TX, PARIENTI JJ, BADIOU G, LECLERCQ R, CATTOIR V. Microbiological investigation and clinical significance of *Corynebacterium* spp. in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 74, p. 236–41, 2012.

OFEK I, DOYLE R. Bacterial adhesion to cell and tissues. *Chapman & Hall*; v. 94, n. 136; p. 321-511, 1994.

OLENDER, A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy*, v. 59, n. 4, p. 294-306, 2013.

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.*, v. 54, p. 109–114, 2006.

ORDOÑEZ-PALAU, S.; BOQUET, D. CHRONIC osteomyelitis of the metatarsal sesamoid due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient with rheumatoid arthritis. *Join Bone Spine*, v. 74, n. 5, p. 509-517, 2007

ORTIZ-PEREZ, A., MARTIN-DE-HIJAS, N. Z., ESTEBAN, J., FERNANDEZ-NATAL, M. I., GARCIA-CIA, J. I., & FERNANDEZ-ROBLAS, R. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microbial Drug Resistance*, v. 16, n. 4, p. 273-277, 2010.

OSTERWALDER B., FREI R., GRATWOHL A., REBER H., SPECK B. Antibiotic-resistant *Corynebacteria*: a new problem of infection in immunosuppressed patients. *Schweiz Med Wochenschr*, v. 116, n. 26, p. 880-884, 1986.

OTEO J, ARACIL B, ALOS JI, GOMEZ-GARCES. Bacteriemias significativas por *Corynebacterium amycolatum*: un patógeno emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, v. 19, n. 3, p. 103-106, 2001.

OTT L. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* invasion associated protein (DIP1281) is involved in cell-surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *B.M.C. Microbiol.*, v.10, p.2, 2010.

OTT, L., McKenzie, A., Baltazar, M. T., Britting, S., Bischof, A., Burkovski, A. & Hoskisson, P. A. Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. *FEMS immunology and medical microbiology*, v. 65, p. 413-421, 2012.

PACHECO, LGC ET AL. A role for sigma factor σ^E in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxide stress. *Frontiers in microbiology*, v. 3, p. 126, 2012.

PAIM, TG, REITER, KC, OLIVEIRA, CF, D'AZEVEDO, PA. Desempenho da metodologia por MALDI-TOF MS na identificação de cocos Gram-positivos isolados na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil. *Journal of Infection Control*, v. 2, n. 2, p. 112-116, 2013.

PAVAN ME, ROBLES C, CAIRO FM, MARCELLINO R, PETTINARI MJ. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase b-subunit gene (rpoB). *Res Vet Sci*, p, 202–206, 2011.

PEEL, MM. *et al.* Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis*, v. 24, n.2, p.185-91, 1997.

PEIXOTO, H., ROXO, M., KRSTIN, S., RÖHRIG, T., RICHLING, E., & WINK, M. An anthocyanin-rich extract of acai (*Euterpe precatoria* Mart.) increases stress resistance and retards aging-related markers in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of agricultural and food Chemistry*, v. 64, n. 6, p. 1283-1290, 2016.

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

PERKIN S, WILSON A, WALKER D, MCWILLIAMS E. Dietzia species pacemaker pocket infection: an unusual organism in human infections. *BMJ Case Reports*, p. 14, 2012.

PESSANHA, B. et al. Infectious endocarditis due to *Corynebacterium xerosis*. *Cardiovascular Pathology*, v. 12, n. 2, p. 98-101, 2003.

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

PITOUT, JDD *et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 7, p. 3129-35, 2005.

PIVOT, D et al. Carriage of a single strain of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* bv. Belfanti (*Corynebacterium belfantii*) in four patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 57, n. 5, p. e00042-19, 2019.

PIZARRO-CERDA, J.; Cossart, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 715-727, 2006.

POIREL L, NAAS T, NICOLAS D, COLLET L, BELLAIS S, CAVALLO JD, NORDMANN P. Characterization of VIM-2, a carbapenêmicos-hydrolyzing metallo-b-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 44, p. 891-897, 2000.

POIREL L, NORDMANN P. Acquired carbapenens-hydrolyzing b-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol.*, v. 3, p. 117-127, 2001.

POPOVIC, T. et al. Molecular epidemiology of diphtheria. *J. Infect. Dis.*, v.181, p.168-177, 2000.

POWELL JR, AUSUBEL FM. Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. *Methods. Mol. Biol.*, p. 403-427, 2008.

PORSCHEN, R. K.; GOODMAN, Z.; RAFAI, B. Isolation of *Corynebacterium xerosis* from clinical specimens. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 68, p. 290-293, 1977.

PORTEVIN, D., DE SOUSA-D'AURIA, C., HOUSSIN, C., GRIMALDI, C., CHAMI, M., DAFPE, M., GUILHOT, C. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 101, p. 314-319, 2004.

PORTOCARRERO B, BALLMER P, HESS T, KARRER U. Secondary hypogammaglobulinemia with recurrent opportunistic pulmonary infection. *Therapeutische Umschau*, v. 69, p. 687-91, 2012.

PRADHAN, D *et al.* Immune modulations and survival strategies of evolved hypervirulent *Salmonella Typhimurium* strains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1864, n. 8, p. 129627, 2020.

PRETE, D.D. et al. Encrusted cystitis by *Corynebacterium urealyticum*: a case report with novel insights into bladder lesions. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 23, n.8, p. 2685-2687, 2008.

QIN, L., SAKAI, Y., BAO, R., XIE, H., MASUNAGA, K., MIURA, M., ... & WATANABE, H. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures of hospitalized patients in Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, v. 70, n. 2, p. 152-157, 2017.

QUINTEIRA S, SOUSA JC, PEIXE L. Characterization of In100, a new integrin carrying a metallo- β -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 49, p. 451-453.

RAMANA, KV *et al.* Non Diphtheritic Corynebacteria (NDC) and Their Clinical Significance: Clinical Microbiologist's Perspective. *American Journal of Epidemiology and Infectious Disease*, v. 2, n. 3, p.83-87, 2014.

RAMOS, JN. Caracterização de estirpes sugestivas de corinebactérias isoladas de sítios intravenosos. [*Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)*]. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

RAMOS, JN *et al.* Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC infectious diseases*, v. 19, n. 1, p. 672, 2019.

REDDY BS, CHAUDHURY A, KALAWAT U, JAYAPRADA R, REDDY GSK, RAMANA BV. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial Corynebacteria (Diphtheroids). *Indian J of Medical Microbiol.*, v. 30, n. 1, p. 52-7, 2012.

RENAUD FN, DUTAUR M, DAOUD S, AUBEL D, RIEGEL P, MONGET D, ET AL. Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum* and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *J Clin Microbiol*, v. 36, p. 3698–702, 1998.

RENOM, F, GOMILA, M, GARAU, M, GALLEGOS, MDC, GUERRERO, D, LALUCAT, J, SORIANO, JB. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New microbes and new infections*, v. 2, n 4, p. 106-114, 2014.

RENOM F, GARAU M, RUBI M, RAMIS F, GALMES A, SORIANO JB. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*, v. 45, p. 2064-2067, 2007.

RICCIO ML, FRANCESCHINI N, BOSCHI L, CARAVELLI B, CORNAGLIA G, FONTANA R, AMICOSANTE G, ROSSOLINI GM. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 44, p 1229-1235, 2000.

RIEGEL P. Bacteriological and clinical aspects of *Corynebacterium*. *Ann Biol Clin.*; v. 56, n. 3, p. 285-96, 1998.

RIEGEL P, RUIMY R, CHRISTEN R, MONTEIL H. Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 15, p. 657–662, 1996.

- RIVIERE E, NEAU D, ROUX X, LIPPA N, ROGER-SCHMELTZ J, MERCIÉ P, LONGY-BOURSIER M. Pulmonary streptomyces infection in patient with sarcoidosis, France, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, p. 1907-9, 2012.
- RIZVI M, KHAN F, RAZA A, SHUKLA I, SABIR AB. Emergence of coryneforms in osteomyelitis and orthopaedic surgical site infections. *The Australasian Medical Journal*;v. 4, p. 412-417, 2011.
- RIZVI, M, RIZVI, MW, SULTAN, A, KHAN, F, SHUKLA, I, MALIK, A. Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical site infections in a tertiary care hospital of North India. *Journal of infection and public health*, v. 6, n. 4, p. 283-288, 2013.
- RIZVI M, KHAN F, RAZA A, SHUKLA I, MALIK A, RIZVI SAR, ET AL. Coryneforms: the opportunistic pathogens - an emerging challenge for immunocompetent individuals. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, v. 6, n. 3, p. 165-71, 2011.
- RODRÍGUEZ-CADENA S, LÓPEZ-MARTÍNEZ LI, GALLEGO SANCHEZ, JA. Encrusted pyelitis in a male with bricker urinary derivation and ureteral catheter. *Archivos Espanoles de Urologia*, v. 74, n. 6, p. 619-622, 2021.
- ROZDZINSKI E, KERN W, SCHMEISER T, KURRLE E. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia at a tertiary care center. *Infection*, v. 19, n. 4, p. 201-204, 1991.
- RUPP, ME. et al. Central venous catheter-related *Corynebacterium minutissimum* bacteremia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 19, n. 10, p. 786-789, 1998.
- SABBADINI, PS, ASSIS, MC, TROST, E, GOMES, DLR, MOREIRA, LO, DOS SANTOS, CS, DOS SANTOS, ALS. *Corynebacterium diphtheriae* hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEP-2 cells. *Microbial pathogenesis*, v. 52, n. 3, p. 165-176, 2012.
- SABBADINI PS. Participação de proteínas 67-72 kDA de superfície celular em processos de aderência e internalização de *Corynebacterium diphtheriae*. 2006. 125 f. [*Dissertação (Mestrado em Microbiologia)*] - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica.
- SAIKYA, L *et al.* Diphtheria outbreak in Assam, India. *South Asian J Trop Med Public Health*, v. 41, p. 647-652, 2010.
- SAMARANAYAKE, LP. *Essential microbiology for dentistry*. Elsevier Health Sciences, 2006.
- SAMPEDRO, MF, DE ALEGRIA PUIG, CR, FARIÑAS, MC. Infecciones por *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.* y *Listeria*. *Medicine Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, v. 11, n. 59, p. 3493-3504, 2014.
- SANTOS CS, SANTOS LS, DE SOUZA MC, DOS SANTOS DF, DIAS AASO, SABBADINI PS, PEREIRA GA, CABRAL MC, HIRATA JR., MATTOS-GUARALDI AL. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiol Immunol.*, v. 54, n. 1, p.:1-10, 2010.

SANTOS, J; SHLIZERMAN, E. Closing the loop: optimal stimulation of *C. elegans* neuronal network via adaptive control to exhibit full body movements. *BMC neuroscience*, v. 16, n. 1, p. 1-2, 2015.

SARIADJI, K et al. Antibiotic Susceptibility Pattern of *Corynebacterium diphtheriae* Isolated from Outbreaks in Indonesia 2010-2015. *The Indonesian Biomedical Journal*, v. 10, n. 1, p. 51-5, 2018.

SATO, K, UCHIYAMA, M. *Corynebacterium jeikeium* bacteraemia and pulmonar infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. *BMJ Case Report*, v. 20, 2012.

SCHMIEL, DH & MILLER, VIRGINIA L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and infection*, v. 1, n. 13, p. 1103-1112, 1999.

SCHRODER, J. et al. Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*, v. 13, n. 141, 2012.

SETO, Y. et al. Properties of coryneophage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn J Infect Dis*, v. 61, p. 116-122, 2008.

SIERRA, J. M., MARTINEZ-MARTINEZ, L., VAZQUEZ, F., GIRALT, E., & VILA, J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, n. 5, p. 1714-1719, 2005.

SIFRI, C. et al. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and immunity*, v. 71, n. 4, p. 2208-2217, 2003.

SILVA-SANTANA, G., SILVA, C. M. F., OLIVELLA, J. G. B., SILVA, I. F., FERNANDES, L. M. O., SUED-KARAM, B. R., ... & MATTOS-GUARALDI, A. L. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976–2020. *Archives of Microbiology*, v. 203, n. 5, p. 1863-1880, 2021.

SIMPSON-LOUREDO L, RAMOS JN., PEIXOTO RS, SANTOS LS, ANTUNES CA, LADEIRA EM, ... & MATTOS-GUARALDI AL. *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, v. 105, n 2, p. 343-352, 2014.

SIMPSON-LOUREDO, L. Aspectos fenotípicos e genotípicos de mecanismos de interação com superfícies bióticas e abióticas, citotoxicidade e atividade fosfolipásica de *Corynebacterium ulcerans*. [Tese de Doutorado] – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2019.

SIMPSON-LOUREDO, L., SILVA, C. M., HACKER, E., SOUZA, N. F., SANTANA, M. M., ANTUNES, C. A., ... & MATTOS-GUARALDI, A. L. (2019). Detection and virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a concurrent

diphtheria and infectious mononucleosis case. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 112, n.), p. 1055-1065.

SJÖDEN, B, FUNKE, G, IZQUIERDO, A, AKERVALL, E, COLLINS, MD. Description of some coryneform bacteria isolated from human clinical specimens as *Corynebacterium falsenii* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, v. 48, n. 1, p. 69-74, 1998.

STEFANSKA, I. et al. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Pol J Vet Sci*, v. 13, n. 1, p. 143-9, 2010

SOUZA, MC. Aderência e viabilidade intracelular em células epiteliais de trato respiratório HEp-2 de amostras de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. Faculdade e Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, MC. Propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose celular de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. [Tese (Doutorado em Ciências Médicas)]. Faculdade e Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SOUZA C, SIMPSON-LOUREDO L, MOTA HF, ET AL. Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 112, n. 9, p. 1331-1340, 2019.

STACKEBRANDT E., GOEBEL B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.*, v. 44, p. 846–849, 1994.

SUGUMARAN, R. *Corynebacterium amycolatum*: an unusual cause of corneal ulcer. *BMJ Case Reports CP*, v. 13, n. 12, p. e237818, 2021.

SUNDSTRÖM, CHRISTER, AND KENNETH NILSSON. "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." *International journal of cancer*, v. 17, n.5, p. 565-577, 1976.

TAM PYI, FISHER MA, MILLER, NS. *Corynebacterium falsenii* bacteremia occurring in an infant on vancomycin therapy. *Journal of clinical microbiology*, v. 48, n. 9, p. 3440-3442, 2010.

TANG, J et al. *Corynebacterium striatum* thrombophlebitis: a nosocomial multidrug-resistant disease?. *Access Microbiology*, v. 3, n. 12, 2021.

TARR PE, STOCK F, COOKE RH, FEDORKO DP, LUCEY DR. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transpl Infect Dis*, v. 5, n. 1, p. 53–58, 2003.

TON-THAT H, MARRAFFINI LA, SCHNEEWIND O. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol.*, v. 53, p. 251-261, 2004.

TON-THAT H, SCHNEEWIND O. Assembly of pili on the surface of *C. diphtheriae*. *Mol Microbiol.*, v. 50, p. 1429-1438, 2003.

TROST, E. *et al.* Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genomics*, v. 12, p. 383, 2011.

TROST, E., ET al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *J. Bacteriol.* 194, 3199–3215, 2012.

TURK S, PUNAB M, MANDAR R. Antimicrobial susceptibility patterns of coryneform bacteria isolated from semen. *Open Infect Dis J*, v. 3, p. 31-6, 2009.

VAN DER LELIE H., LEVERSTEIN-VAN HALL M., MERTENS M., et Al. *Corynebacterium* CDC group JK(*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. *Scand J Infect Dis.*, v. 27, n. 6, p. 581-584, 1995.

VANEECHOUTTE M, BLESER DD, CLAEYS G, VERSCHRAEGEN G, BAERE TD, HOMMEZ J, *et al.* Cardioverter-lead electrode infection which was caused by *Corynebacterium amycolatum*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, p. 1553–54, 1998.

VERROKEN, A, BAURAING, C, DEPLANO, A, BOGAERTS, P, HUANG, D, WAUTERS, G, GLUPCZYNSKI, Y. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 1, p. 44-50, 2014.

VIEIRA S, MARTINS DE MELLO MEIRA A, LUCCHESI DE CARVALHO A, ABREU NEPOMUCENO I, MARTINS OLIVEIRA DINIZ L, MAIA DE CASTRO ROMANELLI R. Atualização em difteria. *Rev Med Minas Gerais*, v. 29, p. S21-S26, 2019.

VOISINE, C *et al.* Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, v. 2, n. 6, p. e504, 2007.

YANAGAWA R, HONDA E. Presence of Pili in Species of Human and Animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. *Infect Immun.*, v. 13, p. 1293-1295, 1976.

YANAGAWA R, OTSUKI K, TOKUI T. Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. *Jpn J Vet Res.*, v. 16, p. 31–37, 1968.

YANG, Y., WU, Q., & WANG, D. Epigenetic response to nanopolystyrene in germline of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 206, p. 111-404, 2020.

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. *The Korean journal of laboratory medicine.*, v.;31, p. 47-48, 2011.

WAGNER, K.S. *et al.* Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiol. Infect.*, v.138, n.11, p.1519-1530, 2010.

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

WAUTERS, G. et al. Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 1430-1432, 1998.

WEINSTEIN MP, TOWNS ML, QUARTEY SM, MIRRETT S, REIMER LG, PARMIGIANI G, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis.*, v. 24, p. 584-602, 1997.

WEN, H.; QUIN, J. Analysis of *Caenorhabditis elegans* in microfluidic devices. *Science China Chemistry.*, v. 55, p. 484-493, 2012.

WILLIAMS DY, SELEPAK ST, GILL VJ. Identification of clinical isolates of nondiphtherial *Corynebacterium* species and their antibiotic susceptibility patterns. *Diag Microbiol Infect Dis*, v. 17, p. 23-28, 1993.

WOJEWODA, CM et al. Bloodstream infection caused by nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an immunocompromised host in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 6, p. 2170-2172, 2012.

WONG JS, SEAWARD LM, HO CP, et al. *Corynebacterium accolens* associated pelvic osteomyelitis. *J Clin Microbiol*; v. 48, p. 654-655, 2010.

WOOD WB. *Introduction to C. elegans biology.*, p. 1-16, 1988.

WOOD, G E.; DUTRO, S M.; TOTTEN, P A. *Haemophilus ducreyi* inhibits phagocytosis by U-937 cells, a human macrophage-like cell line. *Infection and immunity*, v. 69, n. 8, p. 4726-4733, 2001.

WOODFORD N, PALEPOU MFI, BABINI GS, HOLMES B, LIVERMORE DM. Carbapenêmicosases of *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*: distribution of blaB and characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, blaB3, in the type strain, NCTC 10016. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, p. 1448-1452, 2000.

WOOSTER, S. L. et al. Brain abscess due to *Corynebacterium xerosis*. *Journal of Infection*, v. 38, n. 1, p. 55-56, 1999.

ZASADA, A. A. & RZECZKOWSKA, M. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* *Infections, Europe*, 2019.

ZASADA, A. A. & MOSIEJ, E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Letters in applied microbiology*, v. 66, n. 6, p. 472-483, 2018.

ZASADA, AA. Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae*, Poland, 2004–2012. *Emerging infectious diseases*, v. 19, n. 11, p. 1870, 2013.

ZYCHLINSKY, A., & SANSONETTI, P. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *The Journal of clinical investigation*, v. 100, n. 3, p. 493-495.