



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Sara Wilis Cussuol Gomes

**Avaliação de aspectos relacionados à virulência de cepas multidroga-resistentes de *Corynebacterium amycolatum* isoladas de trato urinário de pacientes ambulatoriais**

Rio de Janeiro

2022

Sara Wilis Cussuol Gomes

**Avaliação de aspectos relacionados à virulência de cepas multidroga-resistentes de  
*Corynebacterium amycolatum* isoladas de trato urinário de pacientes ambulatoriais**

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.<sup>a</sup> Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Coorientador: Prof. Dr. Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa

Rio de Janeiro

2022

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

G633 Gomes, Sara Wilis Cussuol.  
Avaliação de aspectos relacionados à virulência de cepas multidroga-resistentes de *Corynebacterium amycolatum* isoladas de trato urinário de pacientes ambulatoriais / Sara Wilis Cussuol Gomes – 2022.  
132 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> 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. Infecções por *Corynebacterium amycolatum* - Teses. 2. *Caenorhabditis elegans* – Teses. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos – Terapia – Teses. 4. Bacilos Gram-Positivos – Patogenicidade. 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

Sara Wilis Cussuol Gomes

**Avaliação de aspectos relacionados à virulência de cepas multidroga-resistentes de *Corynebacterium amycolatum* isoladas de trato urinário de pacientes ambulatoriais**

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 22 de setembro 2022.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Dr. Lincoln de Oliveira Sant'Anna  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Priscila Soares Sabbadini  
Universidade CEUMA

Rio de Janeiro

2022

## **DEDICATÓRIA**

*Aos colegas pesquisadores*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, sabedoria e oportunidades.

Aos meus pais, Roberto e Sonia, e minha irmã Débora, por serem minha base.

Ao meu esposo, Davi, por seu incentivo, cuidado, amor, motivação e paciência.

À minha comunidade de fé em Cristo, a Igreja Batista do Prado pelos ensinamentos e fortalecimento.

Aos meus orientadores, Prof.<sup>a</sup> Louisy Sanches dos Santos e Prof. Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa pela confiança, dedicação e suporte durante toda esta desafiadora jornada.

A querida Prof.<sup>a</sup> Ana Luiza de Mattos-Guaraldi, por todo carinho e dedicação dispensados a mim.

Ao Prof. Raphael Hirata (*in memoriam*), por sua dedicação, exemplo e auxílio durante todos estes anos.

Aos amigos Lorraine, Denise, Luís, Patrícia e Andrew por compartilharmos conhecimentos, alegrias, dificuldades, a vida.

Aos colaboradores Vanilda, Monica e Lincoln, pela prontidão e solicitude.

Aos demais colegas do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC/UERJ) e Laboratório de Microbiologia Experimental e Aplicada (LMEA/ISNF-UFF), pelos ensinamentos e companheirismo.

Aos professores de toda a minha vida, pela inspiração, motivação e conhecimento compartilhado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ (PPG-MICRO/FCM/UERJ), por permitir que esse sonho se tornasse realidade.

Às agências FAPERJ, CNPq, CAPES e SR-2/UERJ, pelo apoio financeiro.

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

“Quão numerosas são as tuas obras, ó SENHOR!  
Fizeste-as todas com perfeita sabedoria. A terra está repleta de tuas criaturas.”

*Salmos 104:24*

## RESUMO

GOMES, Sara Wilis Cussuol. **Avaliação de aspectos relacionados à virulência de cepas multidroga-resistentes de *Corynebacterium amycolatum* isoladas de trato urinário de pacientes ambulatoriais.** 2022. 132 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

*Corynebacterium amycolatum* tem sido cada vez mais relatado como agente etiológico de infecções hospitalares leves a graves. No entanto, investigações do potencial de virulência destes bacilos Gram-positivos irregulares (BGPI) ainda são escassas. Neste estudo, 38 cepas de *C. amycolatum* isoladas do trato urinário de pacientes ambulatoriais, previamente identificadas por espectrometria de massa e classificadas quanto ao seu perfil de resistência aos antimicrobianos foram avaliadas quanto ao seu perfil epidemiológico e fatores relacionados a virulência. Para tanto, foi realizada a pesquisa de genes de resistência aos beta-lactâmicos, ensaios de aderência utilizando células de linhagem epitelial de faringe humana (HEp-2), e o modelo de interação patógeno-hospedeiro *Caenorhabditis elegans*. A maioria das cepas de *C. amycolatum* foi proveniente de pacientes do sexo feminino e 86,84% de todas as amostras expressou perfis multidroga-resistente (MDR) heterogêneos, e dentre estes, sete apresentaram o gene *bla* que codifica a beta-lactamase classe A. Outros BGPI, como *Brevibacterium ravensturnense*, também foram encontrados associados a *C. amycolatum*, apresentando perfil MDR e juntamente com algumas cepas *C. amycolatum* MDR, demonstrou capacidade de aderir às células epiteliais humanas, sugerindo um mecanismo de colonização que pode auxiliar no estabelecimento de uma infecção. A mortalidade e as alterações morfológicas em nematódeos infectados por doze cepas de *C. amycolatum* com diferentes perfis MDR e multidroga-sensíveis (MDS) foram investigadas durante seis dias após a infecção. A morte de *C. elegans* foi observada para todas as cepas testadas de *C. amycolatum*, mas em níveis diferentes. Todas levaram a mais de 60% de mortalidade dos vermes infectados, e a sobrevivência média dos vermes (LT50s) variou entre 3 e 5 dias. Alterações morfológicas na região anal e eclosão interna de ovos em *C. elegans* foram observadas para todas as cepas testadas de *C. amycolatum*. Ademais, um modo incomum de infecção no hospedeiro nematoide, estruturas semelhantes a cistos na região vulvar-útero foram observadas para alguns dos nematódeos expostos às cepas MDR de *C. amycolatum* BR-SW-28 e BR-SW-32, sugerindo infecção uterina. Corroborando outros autores, as cepas mais virulentas apresentaram perfis MDR. Esses achados podem sugerir uma associação entre genes de virulência com genes de resistência, sendo necessários mais estudos para confirmar essa hipótese. O isolamento de corineformes, como *C. amycolatum*, apresentando perfis de MDR reforça a importância da identificação correta para uma melhor abordagem terapêutica e vigilância constante da resistência antimicrobiana desses isolados, além da necessidade de mais estudos a fim de elucidar mecanismos envolvidos na patogenicidade de *C. amycolatum*.

Palavras-chave: Aderência Bacteriana. *Caenorhabditis elegans*. *Corynebacterium amycolatum*. Resistência Microbiana a Medicamentos. Virulência



## ABSTRACT

GOMES, Sara Wilis Cussuol. **Evaluation of aspects related to virulence of multidrug-resistant strains of *Corynebacterium amycolatum* isolated from the urinary tract of ambulatorial patients.** 2022. 132 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

*Corynebacterium amycolatum* has been increasingly reported as an etiologic agent of mild to severe nosocomial infections. studies focused on the virulence potential of *C. amycolatum* remains scarce. In this study, 38 strains of *C. amycolatum* isolated from the urinary tract of ambulatorial patients, previously identified by mass spectrometry and classified according to their antimicrobial resistance profile, were evaluated for their epidemiological profile and virulence-related factors. For that, we performed a search for resistance genes to beta-lactams, adherence assays using human pharyngeal epithelial cells, and the model of pathogen-host interaction *Caenorhabditis elegans*. Most strains of *C. amycolatum* came from female patients and 86.84% of all samples expressed heterogeneous multidrug-resistant (MDR) profiles, and among these, seven had the bla gene that encodes the beta-lactamase class A. Other BGPIs, such as *Brevibacterium ravenburgense*, were also found associated with *C. amycolatum*, presenting an MDR profile and, together with some *C. amycolatum* MDR strains, demonstrated the ability to adhere to human epithelial cells, suggesting a colonization mechanism that may aid in the establishment of an infection. Mortality and morphological changes in nematodes infected by twelve strains of *C. amycolatum* with different MDR and multidrug-sensitive (MDS) profiles were investigated for six days after infection. Death of *C. elegans* was observed for all tested strains of *C. amycolatum*, but at different levels. All led to more than 60% mortality of infected worms, and median worm survival (LT50s) ranged between 3 and 5 days. Morphological changes in the anal region and internal hatching of eggs in *C. elegans* were observed for all tested strains of *C. amycolatum*. In addition, an unusual mode of infection in the nematode host, cyst-like structures in the vulvar-uterus region were observed for some of the nematodes exposed to the MDR strains of *C. amycolatum* BR-SW-28 and BR-SW-32, suggesting uterine infection. Corroborating other authors, the most virulent strains showed MDR profiles. These findings may suggest an association between virulence genes and resistance genes, but further studies are needed to confirm this hypothesis. The isolation of coryneforms, such as *C. amycolatum*, presenting MDR profiles reinforces the importance of correct identification for a better therapeutic approach and constant surveillance of the antimicrobial resistance of these isolates, in addition to the need for further studies in order to elucidate mechanisms involved in the pathogenicity of *C. amycolatum*.

Keywords: Bacterial Adhesion. *Corynebacterium amycolatum*. *Caenorhabditis elegans*. Drug Resistance, Microbial. Virulence.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aderência Agregativa
ARGs	<i>Antimicrobial Resistance Genes</i>
BA	Bacteriúria Assintomática
BGPI	Bacilos Gram-positivos Irregulares
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAMP	<i>Christie–Atkins–Munch–Peterson</i>
CMNR	<i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Rhodococcus</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	Desoxirribonucleic Acid
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
EAS	Elementos Anormais e Sedimentoscopia
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i>
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamases</i>
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G+C	guanina + citosina
HDPP	<i>High Density Porous Poliethilen</i>
HEp-2	Células de linhagem epitelial de faringe humana
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
ISNF	Instituto de Saúde de Nova Friburgo
ITR	Infeções do Trato Respiratório
ITU	Infecção do Trato Urinário
ITUs	Infecções do Trato Urinário
LAM	Lipoarabinomananas
LDCIC	Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica
LM	Lipomananas
LMEA	Laboratório de Microbiologia Experimental e Aplicada

MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MBL	Metalo-beta-lactamases
MDR	Multidroga-resistente
MDS	Multidroga-sensível
OXAs	Oxacilinas
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
Ph	Potencial hidrogeniônico
PLD	Phospholipase D
Prof.	Professor
Prof. <sup>a</sup>	Professora
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
TD	Toxina Diftérica
TR	Transplantados Renais
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
UPEC	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>
XSMA	<i>Corynebacterium xerosis, Corynebacterium striatum, Corynebacterium minutissimum e Corynebacterium amycolatum</i>

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1	<b>Infecção do Trato Urinário</b> .....	13
1.1.1	<u>Vias de infecção</u> .....	13
1.1.2	<u>Classificação da ITU</u> .....	13
1.1.3	<u>Principais fatores predisponentes ou associados a ITU</u> .....	14
1.1.3.1	Sexo e Idade .....	15
1.1.3.2	Gravidez .....	17
1.1.3.3	Diabetes <i>Mellitus</i> .....	18
1.1.3.4	Transplante Renal.....	19
1.1.4	<u>Uropatógenos mais comuns em ITU</u> .....	20
1.1.5	<u>Diagnóstico da ITU</u> .....	21
1.2	<b>Importância clínica dos Corineformes</b> .....	23
1.3	<b>O Gênero <i>Corynebacterium</i></b> .....	23
1.3.1	<u><i>Corynebacterium amycolatum</i></u> .....	25
1.4	<b>Métodos convencionais e moleculares para identificação de corineformes</b> .....	26
1.5	<b>Multirresistência bacteriana</b> .....	29
1.5.1	<u>Produção de Beta-lactamases</u> .....	30
1.5.2	<u>Mecanismos de Resistência descritos em <i>Corynebacterium</i> spp.</u> .....	33
1.6	<b>Virulência bacteriana</b> .....	35
1.6.1	<u>Aderência bacteriana</u> .....	36
1.6.2	<u>Biofilmes bacterianos</u> .....	38
1.6.3	<u>Toxicidade de <i>Corynebacterium</i> spp.</u> .....	41
1.6.4	<u>Sobrevivência no interior de macrófagos</u> .....	41
1.7	<b>Interações patógeno-hospedeiro</b> .....	43
1.7.1	<u>Emprego do nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i> para avaliação da interação patógeno-hospedeiro</u> .....	43
2	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	45
3	<b>RESULTADOS</b> .....	46
3.1	<b>Artigo 1: Infecções do trato urinário adquiridas na comunidade em adultos e crianças causadas por <i>Corynebacterium amycolatum</i>, incluindo cepas MDR e gene <i>bla</i> positivas</b> .....	47

3.2	<b>Artigo 2: Isolamento de cepas MDR e potencialmente invasivas de <i>Brevibacterium ravenpurgense</i> e <i>Corynebacterium amycolatum</i> de uma amostra de urina humana</b> .....	61
3.3	<b>Artigo 3: Potencial heterogênico de virulência, influência da multidroga-resistência e codificação de beta-lactamase classe A pelo gene <i>bla</i> de <i>Corynebacterium amycolatum</i> uropatogênicos durante a infecção por <i>Caenorhabditis elegans</i></b> .....	73
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	87
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	97
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99
	<b>APÊNDICE – Produção científica durante a realização do doutorado</b> .....	131

## INTRODUÇÃO

*Corynebacterium* spp. não produtoras de toxina diftérica (TD) e outros Bacilos Gram-positivos Irregulares (BGPI), geralmente chamados de corineformes, são frequentemente encontrados como constituintes da microbiota humana. No entanto, alguns deles têm sido cada vez mais relatados como agentes causadores de diversas infecções humanas, principalmente devido ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos e melhoria dos métodos de identificação (GHERARDI et al., 2015).

Ao longo dos últimos anos, *Corynebacterium amycolatum* tem sido reportado como agente etiológico de infecções nosocomiais, especialmente em pacientes imunocomprometidos, incluindo endocardite, bacteremia, septicemia, infecção relacionada a cateter, otite, mastite (BERNARD; FUNKE, 2015; BORDE et al., 2020; CARVALHO et al., 2018; MARTINS et al., 2009; RASMUSSEN et al., 2020; SENGUPTA et al., 2015; YAMAMURO et al., 2021). No entanto, há poucos relatos na literatura de casos de infecção do trato urinário (ITU) por *C. amycolatum* tanto no ambiente ambulatorial quanto hospitalar (ROBERT; ANNA; GRAZYNA, 2018).

Cepas de *C. amycolatum* têm frequentemente demonstrado resistência a múltiplos grupos de agentes antimicrobianos como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, clindamicina e rifampicina (ADDERSON et al., 2008; BERNARD; FUNKE, 2015; DRAGOMIRESCU et al., 2020; LAGROU et al., 1998). Um estudo recente reportou resistência à daptomicina, uma droga considerada de última escolha para o tratamento de patógenos Gram-positivos (MITCHELL et al., 2020).

A frequente descrição de perfis multidroga-resistentes (MDR) juntamente com a capacidade de aderir a superfícies bióticas e abióticas e/ou formar biofilmes, que protegem as bactérias contra agentes antimicrobianos e as respostas imunes do hospedeiro, têm demonstrado seu potencial patogênico preocupante (CARVALHO et al., 2018; RAMOS et al., 2019). Apesar do crescente isolamento de cepas MDR de *C. amycolatum* de infecções comunitárias e hospitalares, seu potencial de virulência permanece pouco compreendido.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Infecção do Trato Urinário

A ITU consiste na invasão do trato urinário por microrganismos, podendo apresentar sinais e sintomas variados que, em casos mais graves, podem evoluir para infecção sistêmica (COLLINS, 2019; KAUFFMAN, 2014; NICOLLE, 2013). A ITU está entre as infecções bacterianas mais comuns no ambiente ambulatorial e hospitalar, sendo responsável por quase 10 milhões de atendimentos de saúde e 100.000 hospitalizações por ano, representando uma proporção importante dos custos de saúde como resultado de consultas ambulatoriais, testes diagnósticos e prescrições (BUTLER et al., 2015; CLAEYS et al., 2019; FOXMAN, 2002; GARCIA; SPITZER, 2017; GUPTA; GRIGORYAN; TRAUTNER, 2017).

#### 1.1.1 Vias de infecção

Há três vias para um microrganismo causar uma ITU. Na via mais comum, ascendente ou transuretral, microrganismos, como enterobactérias provenientes do cólon, presentes no períneo ou introito uretral externo podem alcançar e ascender a uretra, bexiga, ureter e rins. Na via hematogênica o microrganismo consegue acesso à bexiga através de uma fístula formada pelo intestino, sendo a principal via que ocorre em neonatos, justificada pela intensa vascularização do rim. Já a via linfática é mais rara, e os microrganismos podem atingir o rim pela vinculação linfática entre o intestino e o rim ou entre o trato inferior e superior (COSTA et al., 2019; FLORES-MIRELES, 2015; LACERDA et al., 2015; SMELTZER; BARE, 2005).

#### 1.1.2 Classificação da ITU

As ITUs podem ser classificadas em sintomáticas ou assintomáticas. ITUs sintomáticas são caracterizadas pela presença de sintomas clássicos como mal-estar, disúria, aumento da

frequência urinária, lombalgia e febre (DAUTT-LEYVA et al., 2018). A ITU assintomática, também conhecida como bacteriúria assintomática (BA), pode ser definida pela presença de bactérias na urina com contagem significativa ( $\geq 10^5$  UFC/mL) em pacientes assintomáticos (ALVES et al., 2022).

Quanto à localização, a ITU é classificada como baixa quando compromete somente o trato urinário inferior, caracterizando o diagnóstico de cistite ou uretrite, ou alta, também denominada de pielonefrite, comprometendo o trato urinário superior, que na maioria das vezes traz consigo sintomas mais graves (FIGUEIREDO; GOMES; CAMPOS, 2012; WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2013; SUSKIND et al., 2016). A pielonefrite, comumente se inicia a partir do quadro de cistite, e frequentemente se manifesta subitamente com sinais e sintomas de inflamação sistêmica (febre, calafrios e mal-estar) e inflamação da bexiga (frequência urinária, urgência e disúria). Os sintomas gerais de um processo infeccioso agudo podem também estar presentes, e sua intensidade é diretamente proporcional à gravidade da pielonefrite (JOHNSON; RUSSO, 2018; VIEIRA NETO, 2003).

ITUs associadas a alguns fatores que favorecem a ocorrência da infecção, tais como aparelho urinário com alterações estruturais e/ou funcionais, infecções prévias, insuficiência renal ou outras comorbidades que afetam a capacidade imunológica ou ainda quando se desenvolve em ambiente hospitalar, são denominadas complicadas e têm maior risco de falha terapêutica. Habitualmente, as cistites são infecções não complicadas, enquanto as pielonefrites são frequentemente complicadas, pois em geral resultam da ascensão de microrganismos do trato urinário inferior. Portanto, se a cistite não for tratada também pode afetar os rins, causando pielonefrite e outras complicações (KALINDERI et al., 2018; RORIZ-FILHO et al., 2010; WAGENLEHNER; NABER, 2006).

### 1.1.3 Principais fatores predisponentes ou associados a ITU

Alguns fatores inerentes ao hospedeiro favorecem o crescimento microbiano e, por consequência, a ocorrência da infecção do trato urinário (HEILBERG; SCHOR, 2003).



### 1.1.3.1 Sexo e Idade

Notoriamente, a mulher apresenta maior suscetibilidade à ITU devido às suas características anatômicas, como a uretra curta e sua proximidade com o ânus, o que facilita a invasão e colonização da uretra por bactérias, principalmente as enterobactérias, como a *Escherichia coli* (GYFTOPOULOS et al., 2019). Estudos mostram que mais de 50% das mulheres terão pelo menos um episódio de ITU durante a vida e que cerca de 11% têm ITU ao menos uma vez por ano (FOXMAN et al., 2000; GEERLINGS, 2016).

O homem é menos suscetível a ITU por apresentar maior comprimento uretral, maior fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático. O papel da circuncisão é controverso, embora estudos apontem uma menor incidência em homens circuncidados, provavelmente pela menor ligação de enterobactérias à mucosa do prepúcio (SINGH-GREWAL; MACDESSI; CRAIG, 2005). Contudo, a partir da quinta e sexta década de vida, a presença do prostatismo torna o homem mais suscetível à ITU, pois o alargamento da próstata contribui para o acúmulo de urina residual com consequente proliferação de bactérias, além da maior necessidade de cateterização urinária nesses pacientes (LOPES; TARJA, 2008; HEILBERG; SCHOR, 2003).

Todas as faixas etárias podem contrair ITU, mas durante o primeiro ano de vida a infecção atinge preferencialmente o sexo masculino devido ao maior número de malformações congênitas, especialmente da válvula de uretra posterior. Durante a infância, e principalmente na fase pré-escolar, as meninas são acometidas 10 a 20 vezes mais do que os meninos. Na vida adulta, a incidência se eleva e o predomínio no sexo feminino se mantém, com picos de maior acometimento no início ou relacionado à atividade sexual, durante a gestação ou na menopausa (HEILBERG; SCHOR, 2003; MASSON et al., 2020).

A menor ocorrência de BA entre celibatárias indica que a atividade sexual e a cistite aguda podem estar relacionadas. A transferência física, aumento das secreções e trauma decorrentes do intercurso vaginal facilitam a entrada e ascendência de potenciais patógenos. O uso de métodos contraceptivos como diafragma e geleia espermicida também tem sido considerado fator predisponente para ocorrência de ITU. A presença do dispositivo diafragma pode levar a uma discreta obstrução uretral que não se associa ao maior risco de infecção. No entanto, quando há associação com a geleia espermicida, ocorrem alterações do pH e da microbiota vaginal residente (perda dos lactobacilos que mantém a acidez do pH vaginal), favorecendo o estabelecimento e ascendência de outros microrganismos ao trato urinário (AYUB et al., 2016; FOXMAN et al., 1995).

A frequência de ITU aumenta com a idade em ambos os sexos, devido a alterações imunológicas e diminuição das funções fisiológicas e, conseqüentemente, aumento das doenças crônicas e debilitantes. Para ambos os sexos, a presença de patologias coexistentes como diabetes, acidentes vasculares cerebrais, demência, alterações na resposta imune e hospitalização e/ou instrumentação mais frequente tornam a ITU mais prevalente nesta faixa etária (HEILBERG; SCHOR, 2003; MOUTON et al., 2001; TANG; CHAO, 2016; WERNER; KUNTSCHE, 2000; RODRIGUEZ-MAÑAS, 2020).

No homem idoso, além da doença prostática e suas implicações, a ITU pode ser decorrente de estreitamento uretral e outras anormalidades anatômicas. A hiperplasia prostática benigna (HPB) ou prostatismo, pertence às doenças mais frequentes em homens idosos, e é caracterizada por um aumento benigno dos tecidos prostáticos (MOBLEY; FEIBUS; BAUM, 2015; SARMA; WEI, 2012).

Embora muitos homens com HPB não apresentem sintomas, mais da metade dos homens na faixa dos 60 anos a até 90% dos octogenários apresentam sintomas do trato urinário inferior relacionados à micção obstrutiva como hesitação urinária, atraso no início da micção, intermitência, interrupção involuntária da micção, urina fraca, esforço para esvaziar, sensação de esvaziamento incompleto e gotejamento terminal, ou sintomas de armazenamento da bexiga, como frequência urinária, noctúria, urgência, incontinência e disúria (CHUGHAI et al., 2016; SARMA; WEI, 2012). A ocorrência de HPB ou carcinoma de próstata, traduz uma situação de obstrução ao fluxo urinário com conseqüente esvaziamento vesical incompleto, favorecendo a ocorrência de ITU devido a presença de urina residual e também da necessidade mais frequente de cateterização urinária. A ITU em pacientes com HPB é muito mais grave do que em pacientes com trato urinário anatômica-funcionalmente normal. As bactérias que causam a infecção geralmente sobem da uretra e se multiplicam na bexiga. A bexiga é significativamente menos frequentemente infectada por via hematogênica, linfogênica ou por via contínua a partir dos focos circundantes (bactérias da próstata na prostatite bacteriana crônica) (JACOBSEN et al., 2008; KRIČKOVIĆ et al., 2020).

Além da menopausa, alterações anátomo-funcionais da bexiga relacionadas ou não à multiparidade, como cistocele, o próprio acúmulo de infecções recorrentes, acabam por também aumentar a incidência de ITU em mulheres idosas. A própria infecção urinária estimula a hiperreflexia do detrusor e a endotoxina da *E. coli* inibe as contrações  $\alpha$ -adrenérgicas uretrais reduzindo a pressão esfínteriana, resultando em incontinência urinária. Na menopausa, ocorre diminuição ou falta de estrógeno, hormônio que naturalmente estimula o crescimento e a proliferação da mucosa vaginal facilitando a remoção de bactérias patogênicas, além de

promover o acúmulo de glicogênio pelas células epiteliais, favorecendo o crescimento de lactobacilos que reduzem o pH vaginal tornando-o hostil para microrganismos, como enterobactérias. Isso expõe a mulher a um maior risco de bacteriúria e ITU sintomática, pela redução do glicogênio, ausência de lactobacilos e elevação do pH vaginal. Sabe-se que a colonização vaginal por *E. coli* é um pré-requisito para ascendência da bactéria ao trato urinário. Em culturas seriadas de introito vaginal, 56% de pacientes pós-menopausadas com ITU recorrente eram carreadoras de enterobactérias, especialmente de *E. coli* (HEILBERG; SCHOR, 2003).

#### 1.1.3.2 Gravidez

No caso das mulheres, a gestação se configura um fator predisponente adicional para ocorrência de ITU, devido às alterações fisiológicas e anatômicas que favorecem o desenvolvimento deste tipo de infecção, e tornando esta a segunda complicação mais comum nos períodos gestacionais (AMIRI et al., 2015; GLASER; SCHAEFFER, 2015; SZWEDA; JÓZWIK, 2016).

Durante a gravidez, ocorre uma maior compressão mecânica devido ao aumento útero, ocasionando estase urinária nos ureteres, esvaziamento incompleto da bexiga e, produzindo como consequência o refluxo vesicoureteral, aumento do pH e volume residual de urina; favorecendo o desenvolvimento de bacteriúria durante esta fase (DAUTT-LEYVA et al., 2018; GUGLIETTA, 2017; TAYE et al., 2018). Além disso, o hiperestrogenismo favorece a adesão ao urotélio de certas estirpes de *E.coli* portadoras de adesinas tipo 1 (FIGUEIREDO et al., 2012).

Durante a gravidez todas as infecções urinárias devem ser encaradas como complicadas. A prevalência de BA é de até 10% em grávidas, podendo ser observada do início da gestação ao 3º trimestre, que se não tratadas podem evoluir para infecção sintomática, até pielonefrite, devido à dilatação fisiológica do ureter e pelve renal facilitando o refluxo, havendo também risco de necrose papilar. (DUARTE et al., 2008). O número prévio de gestações está diretamente relacionado ao aumento da incidência de bacteriúria. Prematuridade, baixo peso e mortalidade perinatal, além de maior morbidade materna podem decorrer de uma ITU na gravidez (HEILBERG; SCHOR, 2003).

### 1.1.3.3 Diabetes *Mellitus*

Mundialmente, o Diabetes *Mellitus* (DM) é considerado um dos problemas de saúde mais desafiadores do século XXI, afetando todos os aspectos da vida do paciente, incluindo qualidade de vida, emprego e até mesmo causando a morte prematura, sendo considerada a quinta causa de morte em países desenvolvidos (PRABHAKAR, 2016; SUSAN VAN et al., 2010). As alterações imunológicas decorrentes da DM, tais como depressão na atividade ou na quantidade dos neutrófilos, o aumento da aderência dos uropatógenos, por maior expressão da fimbria tipo 1, que adere com o dobro de afinidade às células uroepiteliais e sistema antioxidante prejudicado, tornam os pacientes com DM mais propensos a infecções como ITU, infecções do Trato Respiratório (ITR), infecções de pele e tecidos moles (DELAMAIRE et al., 1997; FORLAND; GEERLINGS et al., 2002; SHAH; HUX, 2003; SHAH et al., 2019, THOMAS, 1985). O controle metabólico deficiente do diabetes, e esvaziamento incompleto da bexiga devido à neuropatia autonômica, também podem contribuir na patogênese das ITUs em pacientes diabéticos. Fatores que aumentam o risco de ITU em diabéticos incluem idade, controle metabólico e complicações a longo prazo, principalmente nefropatia e cistopatia diabéticas. (BROWN et al., 2005; FÜNFSTÜCK et al., 2012; GEERLINGS et al., 2000; HOSKING; BENNETT; HAMPTON, 1978; TRUZZI et al., 2008).

O espectro de ITU nesses pacientes varia de BA a ITU baixa, pielonefrite e urosepse grave. Complicações graves da ITU, como cistite enfisematosa e pielonefrite, abscessos renais e necrose papilar renal, são encontradas com mais frequência no diabetes tipo 2 do que na população geral (MNIF, et al., 2013; KOFTERIDIS et al., 2009). Estudos relataram um aumento da prevalência de BA em pacientes diabéticos, com estimativas variando de 8% a 26% (FÜNFSTÜCK et al., 2012; GEERLINGS et al., 2002; SCHNEEBERGER; KAZEMIER; GEERLINGS, 2014; ZHANEL; NICOLLE; HARDING, 1995). Uma meta-análise de 22 estudos, encontrou uma prevalência pontual de 12,2% de BA entre pacientes diabéticos versus 4,5% em indivíduos controles saudáveis (RENKO et al., 2011).

A prevalência de ITU é alta entre os pacientes com DM (IJAZ et al., 2014; PARGAVI et al., 2011; SEWIFY et al., 2016; YADAV et al., 2015). Estudos demonstram que os pacientes diabéticos apresentam maior probabilidade de desenvolver ITU (2 a 5 vezes), e evoluírem para quadros mais graves, quando comparados a pacientes não diabéticos (HOPELMAN, 2004; NITZAN et al., 2015). Trabalhos demonstram prevalência de ITU em torno de 40-50% entre pacientes diabéticos, sendo as mulheres mais acometidas (IJAZ et al., 2014; SHAH et al., 2019).

Concentrações mais altas de glicose na urina, decorrente da DM descontrolada apresentam-se como principal causa desta alta prevalência, pois podem promover o crescimento de bactérias patogênicas (FÜNFSTÜCK et al., 2012; WANG et al., 2013). Além disso, Ijaz e colaboradores (2014) reportaram uma prevalência ainda maior em pacientes com idade superior a 55 anos (68,6%).

Além da propensão em adquirir ITU, esses pacientes parecem ser mais suscetíveis a microrganismos resistentes, incluindo os membros da família *Enterobacteriaceae* positivas para beta-lactamase de espectro estendido (*Extended-spectrum beta-lactamases* - ESBL), uropatógenos resistentes a fluoroquinolonas, *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos, e *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (INNS et al., 2014; PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS et al., 2014; SCHECHNER et al., 2013; WU et al., 2014). As altas taxas de prescrição de antimicrobianos para ITU, incluindo os de amplo espectro, podem induzir ainda mais a disseminação de uropatógenos urinários resistentes a antimicrobianos nesses pacientes (VENMANS et al., 2009). Por conta disto, é indicado a prescrição de antimicrobianos somente em casos sintomáticos, pois a BA é um achado comum nesses pacientes, e o tratamento deve ser adaptado de acordo com a gravidade da infecção e os resultados da cultura (NITZAN et al., 2015).

#### 1.1.3.4 Transplante Renal

Os avanços no tratamento imunossupressor proporcionaram melhores taxas de sobrevivência dos transplantados. No entanto, as complicações infecciosas, resultantes, dentre outros fatores, desta imunossupressão, são intercorrências comuns, sendo o trato urinário o local de infecção mais comum (ABU et al., 2021). Graus aumentados de disfunção imunológica predispoem à infecção em inóculos microbianos mais baixos ou com organismos menos virulentos ou a infecções de gravidade maior do que a esperada. Enquanto no final dos anos oitenta a causa mais comum de admissão dentro de 24 meses após o transplante estava relacionada à rejeição em 44% dos pacientes, atualmente a infecção é a principal razão para o tratamento hospitalar, estando presente até 40% dos pacientes (DHARNIDHARKA; STABLEIN; HARMON, 2004; FISHMAN, 2017; TRZECIAK et al., 2004).

A ITU é a infecção mais comum em transplantados renais (TR), cuja incidência varia devido, principalmente, a diferenças dos métodos de vigilância, uso de antimicrobianos

profiláticos, dentre outras condutas (BROWN, 2002). Estima-se que pelo menos 85% dos TR desenvolverão pelo menos um episódio de ITU após o transplante, sendo a maioria assintomática, e apresentando recorrência em 45% dos casos. A ITU é a causa mais comum de sepse em TR, sendo responsável por 30% de todas bacteremias deste subgrupo de pacientes, e morte de 11% dos TR durante o primeiro mês pós-transplante (SANTIAGO et al., 2016; YACOUB et al, 2011).

O desenvolvimento de ITU em TR tem sido relacionado a diferentes fatores de risco incluindo sexo do paciente, sendo as mulheres as mais acometidas, tempo de hemodiálise antes do transplante, histórico de ITU recorrente, tempo de cateterização renal pós-transplante, refluxo vesíco-uretral, doença do rim policístico, DM e mais de 2 episódios de BA (CHUANG; PARIKH; LANGONE, 2005).

*E. coli* juntamente com *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp. somam mais de 90% de todos agentes nessas infecções, entretanto, tem sido relatada ITU por *Corynebacterium urealyticum* em 10% dos casos contra 2% na população normal. Estes patógenos podem ser adquiridos a partir do rim do doador, da ferida cirúrgica, do uso de cateteres urinários e do ambiente hospitalar, ou até mesmo microrganismos endógenos latentes podem ser reativados devido ao uso de drogas imunossupressoras (HEILBERG; SCHOR, 2003).

#### 1.1.4 Uropatógenos mais comuns em ITU

A maioria das ITUs são causadas por *E. coli*. Entretanto, alguns fatores como idade e outras comorbidades parecem estar associados a incidência de outros agentes etiológicos como *Proteus mirabilis* no sexo masculino, responsável por 30% dos casos, *Klebsiella* spp. predominantemente isolada em recém-nascidos e *Staphylococcus saprophyticus* em adolescentes (BEHZADI et al., 2010; FARAJNIA et al., 2009; GOMES et al., 2017). Microrganismos habitualmente não uropatogênicos, e que são de difícil tratamento em infecções nosocomiais, como *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis* e fungos (*Candida* spp.) podem causar ITU em situações específicas como imunodepressão, manipulações cirúrgicas, malformações do trato urinário e uso de cateteres (FUCK, 2009). Em grupos específicos, como em mulheres grávidas e idosos, as bactérias Gram-positivas são encontradas mais frequentemente como agentes etiológicos da ITU (GAJDÁCS et al., 2020; KLINE; LEWIS, 2016; MAHONY et al.,

2020).

### 1.1.5 Diagnóstico da ITU

Embora o diagnóstico de ITU seja baseado inicialmente nos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo, diversos exames laboratoriais corroboram o diagnóstico e contribuem para a escolha do tratamento. Comumente, o exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS) é utilizado como critério suficiente para determinar a conduta médica. Contudo, a urocultura quantitativa é o padrão-ouro no diagnóstico de ITU, pois ela não só indica a ocorrência de multiplicação bacteriana no trato urinário, como também permite o isolamento do agente etiológico e o estudo de sua sensibilidade aos antimicrobianos através do antibiograma (ANVISA, 2004; PIRES et al., 2007; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Culturas feitas em meios à base de ágar, usados desde o século 19 para determinar a presença ou ausência de bactérias, são usados para determinar se a urina é estéril ou se há bacteriúria. Em 1956, foi proposto que a contaminação pode ser distinguida da verdadeira bacteriúria pela quantificação do número de bactérias na urina, sendo a “bacteriúria verdadeira” aquela resultante da multiplicação real de bactérias no trato urinário com uma contagem de  $10^5$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) (KASS, 2002). Estudos clínicos definiram “bacteriúria significativa” com limites que variam de 100 a 100.000 UFC/mL (BENT et al., 2002, FINUCANE, 2017).

As definições de “bacteriúria significativa” e “sintomas do trato urinário” são dois critérios diagnósticos comumente utilizados para definir ITU, que por vezes acompanhados de uma crença explícita de que as bactérias não são habitantes normais do trato urinário, encorajam o uso excessivo de antimicrobianos para tratar essa intercorrência. Os “sintomas do trato urinário”, tais como frequência, urgência, dor suprapúbica, são altamente imprecisos, principalmente em grupos específicos, como os idosos, e portanto, não indicam de forma confiável o risco ou a presença bacteremia decorrente de ITU (ITU bacterêmica ou urosepse) ou pielonefrite (FINUCANE, 2017; HOOTON et al., 2009). Além disso, termos como “flanco” e “lombo” podem referir-se geralmente a qualquer região abdominal inferior, lombar ou inguinal, ou nos homens, ao conteúdo escrotal, o que dificulta ainda mais o diagnóstico de pielonefrite (WOODFORD et al., 2011).

Evidências demonstram que a urina não é estéril, mas sim que o trato abriga um microbioma complexo, o urobioma, que é geralmente benéfico. O trato urinário possui um microbioma cujos táxons são semelhantes aos do intestino, sendo *Lactobacillus* spp. as espécies mais comuns (HILT et al., 2014; O'BRIEN et al., 2016; PEARCE et al., 2014).

Doenças urológicas não infecciosas, como disfunção neurogênica da bexiga, cistite intersticial e incontinência urinária de urgência têm sido associadas à alterações na microbiota urinária (WHITESIDE et al., 2015). A urina de pacientes com cistite intersticial exibe menor diversidade bacteriana e maior abundância de *Lactobacillus* spp. quando comparada a controles saudáveis (URSELL et al., 2012). Esses achados sugerem que alguns casos de “suspeita de ITU” podem ser expressões sintomáticas de desequilíbrio da microbiota residente, podendo ser exacerbada por antimicrobianos. Além disso, o uso de antimicrobianos profiláticos de baixa dose para prevenir infecções recorrentes pode contribuir ainda mais para o surgimento de patógenos resistentes, criando células bacterianas persistentes. As células persistentes são geneticamente semelhantes às gerações anteriores, mas exibem uma maior virulência e *fitness*, otimizando sua colonização permanente no ambiente microbiano indígena (GONEAU et al., 2014). A ITU recorrente pode estar associada à incapacidade de reconstituir a microbiota residente, seja como resultado do uso prolongado de antimicrobianos ou de outros fatores inerentes ao hospedeiro (LANGFORD et al., 2021; STAPLETON, 2014) O reconhecimento da importância do urobioma deve, em última análise, avançar os esforços para limitar o tratamento antimicrobiano excessivo (FINUCANE, 2017).

Dessa forma, a definição de uma cultura de urina positiva deve ser correlacionada com a presença de sintomas e método de coleta da amostra urinária. Comumente, para o diagnóstico de cistite ou pielonefrite em mulheres, preconiza-se uma contagem de urina de jato médio  $\geq 10^5$  UFC/mL. Entretanto, para pacientes idosas ou portadoras de comorbidades, contagens inferiores a  $10^5$  UFC/mL devem ser observadas com atenção. Dados apontam contagens  $< 10^5$  UFC/mL isoladas de mulheres diabéticas com bom controle metabólico e sem complicações a longo prazo que apresentam cistite aguda não complicada (20% a 25% mulheres na pré-menopausa e cerca de 10% das mulheres na pós-menopausa). Além disso, cerca de 5% dos pacientes com pielonefrite aguda têm contagens quantitativas mais baixas isoladas. Contagens bacterianas mais baixas são encontradas com mais frequência em pacientes que já fazem uso de antimicrobianos e acredita-se que resultem da capacidade de concentração renal prejudicada ou diurese, que limita o tempo de permanência da urina na bexiga. Assim, em mulheres sintomáticas com piúria e contagem de urina  $\geq 10^2$  UFC/mL, a ITU poderia ser suspeita (FÜNFSTÜCK et al., 2012; NITZAN et al., 2015).



## 1.2 Importância clínica dos Corineformes

Corineformes, ou também chamados difteroides, são bacilos Gram-positivos, catalase positivos, pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Dermabacter*, *Exiguobacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Oerskovia Rothia*, dentre outros. Esses bacilos foram historicamente quase sempre descartados como contaminantes quando recuperados de pacientes, mas nas últimas décadas houve um aumento nos relatos de infecções por corineformes que incluem não apenas o gênero *Corynebacterium*, mas também outros gêneros e espécies afins, como *Dermobacter* spp., *Brevibacterium* spp. entre outros (BERNARD, 2012; BERTONA et al., 2016; FARAGE; MILLER; MAIBACH, 2009).

*Corynebacterium* spp., principal representante deste grupo, têm sido isoladas de variados espécimes e sítios de infecção sendo os principais o trato urinário e respiratório inferior, cateter e sangue, liquor, líquido peritoneal, feridas cirúrgicas, além de lesões cutâneas, ossos, abscessos e secreção ocular (CAMELLO et al, 2003; FUNKE; BERNARD, 2011; MARTINS et al, 2009; PEIXOTO et al., 2016).

O aumento do número de espécies de *Corynebacterium* isoladas de amostras de urina ao longo dos anos indica o importante papel dessas bactérias na epidemiologia da ITU, principalmente em mulheres (ROBERT; ANNA; GRAŻYNA, 2018).

## 1.3 O Gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium*, juntamente com os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* compõe o grupo CMNR. Este é caracterizado por bacilos Gram-positivos, que apresentam uma camada peptidoglicana ligada covalentemente a uma malha de arabinogalactano, além da presença de uma camada externa de ácido micólico (maioria das espécies) e alto conteúdo guanina + citosina (G+C) no genoma (BAIRD; FONTAINE, 2007; DORELLA et al., 2006; FUNKE et al, 1997; FUNKE; BERNARD, 2011; KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004; OLENDER, 2012).

As corinebactérias (do grego *korune*= forma de clava) são bactérias que tendem a ser claviformes quando cultivadas em meios de cultura artificiais/sintéticos e são observadas ao

microscópio. Não formam esporos, sendo afuniladas, e não apresentam flagelos ou cápsulas. Formas cocobacilares também podem ser observadas, dependendo das condições e tempo de cultivo. O tamanho pode variar de 2 a 6 µm de comprimento e 0,5 a 1,1 µm de diâmetro. Devido à sua forma de divisão, ângulos agudos são formados conferindo o aspecto de “letras chinesas” quando visualizadas em um esfregaço corado pelo método de Gram (CHUNG et al., 2008; FUNKE; BERNARD, 2011; JANDA, 1998; RENOM et al., 2007). A maioria das espécies são anaeróbias facultativas na sua necessidade de crescimento e apresentam metabolismo fermentativo de carboidratos. Algumas espécies requerem lipídios para o crescimento, e se multiplicam melhor em meio contendo 0,1-1% de polissorbato 80 (também conhecido como polyoxietileno-sorbitan-20 mono-oleato ou Tween 80) em comparação com o meio sem o Tween 80 (JANDA, 1998; KONEMAN, 2008).

O gênero *Corynebacterium*, primeiramente descrito por Lehmann & Neumann (1896), atualmente abriga 136 espécies descritas válidas (PARTE et al., 2020) distribuídas diversos nichos ecológicos, como amostras clínicas humanas, animais, solo, água, alimentos, amostras de processamento industrial e materiais sintéticos. Alguns *Corynebacterium* spp. são patógenos bem conhecidos de humanos ou animais; outras espécies fazem parte da microbiota residente, embora ocasionalmente possam causar infecções em humanos ou podem ser transmitidas a humanos por contato zoonótico (BERNARD, 2012; JAÉN-LUCHORO et al., 2020).

A espécie mais conhecida do gênero é o patógeno humano *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria, uma doença bacteriana toxêmica de evolução aguda como uma importante causa de mortalidade e letalidade em todo o mundo (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; JANDA, 1998; TROST et al., 2012; ZASADA, 2015). A toxina diftérica (TD) é codificada pelo gene *tox*, que é transportado em um corinefago, e apresenta tropismo pelo miocárdio, rins, sistema nervoso e glândulas suprarrenais, atuando na inibição da síntese proteica, levando a morte das células suscetíveis, causando os principais sintomas da difteria clássica que incluem fraqueza, prostração e dificuldade de deglutição. A infecção se dá por contato direto, espirro ou tosse, com variável período de incubação de 2 a 6 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Os sintomas iniciais são inespecíficos semelhantes aos de infecções respiratórias virais. O início da infecção é caracterizado pelo discreto aumento de volume das tonsilas, além da hiperemia de toda faringe. Em seguida, ocorre a formação das placas esbranquiçadas ou amarelo-acinzentadas (pseudomembrana), o que torna a respiração difícil (TSINZERLING et al., 1980). Eventualmente, a tosse pode remover partes da pseudomembrana, aliviando temporariamente a situação do paciente, e após vários acessos de tosse a pseudomembrana pode até ser removida e a cura pode ser alcançada, mas

frequentemente, a obstrução das vias aéreas resulta em asfixia, agonia e morte. Nas regiões tropicais e subtropicais, a difteria do trato respiratório é superada em número pela difteria cutânea, que se caracteriza por lesões cutâneas localizadas predominantemente nos pés, pernas e mãos, normalmente persistente por meses (BURKOVSKI, 2013).

Três espécies foram inicialmente descritas como potenciais produtoras de TD: *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* (HOLMES, 2000; BERNARD; FUNKE, 2015). O número de espécies potencialmente produtoras de TD aumentou para seis com a inclusão de *Corynebacterium belfantii* (DAZAS et al., 2018), *Corynebacterium rouxii* (BADELL et al., 2020) e *Corynebacterium silvaticum* (DANGEL et al., 2020). Essas seis espécies formam agora o complexo *C. diphtheriae* (BADELL et al., 2020).

Além das corinebactérias produtoras de TD, *Corynebacterium* spp. não produtoras de TD podem fazer parte da microbiota humana e/ou atuar como patógenos oportunistas, os quais já foram reportados como agentes etiológicos de infecções do trato urinário, bacteremia, endocardite, meningite, entre outras. Dentre estes, destacam-se *Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium macginleyi*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium propinquum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis* (BAIO et al., 2013; CAMELLO et al., 2003; CARVALHO et al., 2018; DOBLER; BRAVENY, 2002; FERNÁNDEZ-NATAL et al., 2008; GHERARDI et al., 2015; MANZELLA; KELLOGG; PARSEY, 1995; MARULL; CASARES, 2008; MORRIS; GUILD 1991; MUNIAN et al., 1997; ORDÓÑEZ-PALAU; BOQUET, 2007; PRETE et al., 2008; RAMOS et al., 2019; WANG; MATTSON; WALD, 2001).

### 1.3.1 *Corynebacterium amycolatum*

*C. amycolatum* pertence a microbiota humana, sendo descrito pela primeira vez em 1988 e recebendo essa nomenclatura por não possuir ácido micólico em sua parede celular ao contrário de outras corinebactérias (COLLINS; BURTON; JONES, 1988). Se tornou amplamente reconhecido como um importante patógeno, e é conhecido como a causa da endocardite adquirida na comunidade em pacientes que têm doença cardíaca ou são

imunocomprometidos e sofrem de endocardite protética da válvula (KNOX; HOLMES, 2002). Este microrganismo vem sendo isolado de infecções nosocomiais, principalmente em amostras clínicas de pacientes imunossuprimidos, incluindo, urina, secreções variadas e sangue (BORDE et al., 2020; CARVALHO et al., 2018; FUNKE; BERNARD, 2007; RASMUSSEN; MOHLIN; NILSON, 2020; SENGUPTA et al., 2015; YAMAMURO et al., 2020). Dados recentes mostram que as taxas de resistência de espécies de *Corynebacterium*, incluindo *C. amycolatum*, aos beta-lactâmicos, classe de antimicrobianos mais amplamente utilizada, são relativamente altas (ABE et al., 2021; NEEMUCHWALA et al., 2018). Além dos beta-lactâmicos, *C. amycolatum* tem demonstrado um fenótipo MDR, apresentando altas taxas de resistência aos aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, além de clindamicina e rifampicina, e mostrando suscetibilidade apenas aos glicopeptídeos (ADDERSON et al., 2008; DRAGOMIRESCU et al., 2020; FUNKE; BERNARD 2007; LAGROU et al., 1998). Um estudo recente, relatou resistência à daptomicina, considerada uma droga de “último recurso” para o tratamento de patógenos bacterianos Gram-positivos por uma cepa de *C. amycolatum* (MITCHELL et al., 2021).

#### 1.4 Métodos convencionais e moleculares para identificação de corineformes

Apesar do crescente número de espécies sendo relatadas como agente etiológico de diversas infecções, a importância dos isolados de *Corynebacterium* spp. em ambientes clínicos ainda é subestimada, seja porque o número de organismos presentes está abaixo do limite de cultura de  $10^3$  UFC/mL, ou porque essas bactérias crescem mais lentamente em meios de cultura usuais e requerem condições especiais de cultura, como meios enriquecidos e seletivos ou tempo de incubação prolongado, ou até porque sejam identificadas incorretamente (DRAGOMIRESCU et al., 2020; HILT et al., 2014).

O grupo XSMA, por exemplo, atualmente composto por quatro espécies (*C. xerosis*, *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. amycolatum*) fenotipicamente muito similares, exige o emprego de técnicas moleculares e testes fenotípicos adicionais não utilizados rotineiramente nos laboratórios clínicos para sua diferenciação (RENAUD et al., 1998; WAUTERS et al., 1998). Em diferentes situações clínicas, algumas das espécies, em especial *C. amycolatum* e *C. striatum* foram descartadas como membros contaminantes da microbiota da pele. Entretanto,

ambas as espécies podem apresentar o fenótipo MDR e serem confundidos clinicamente como *C. minutissimum* ou *C. xerosis* (VOISIN et al., 2002).

A identificação precisa de isolados clínicos corineformes é importante para fins de tratamento porque algumas das espécies, como *C. amycolatum*, *C. jeikeium* e *C. urealyticum*, são intrinsecamente resistentes aos antimicrobianos. A identificação fenotípica de corinebactérias não-diftéricas permanece rotineiramente problemática em laboratórios de diagnóstico clínico e a maioria dos isolados permanece identificada apenas ao nível de gênero (LETEK et al., 2006; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

Meios seletivos à base de 5% de sangue de carneiro contendo 100 µg/ml de fosfomicina são comumente utilizados para isolamento da maioria das espécies de *Corynebacterium*, pois este grupo de bactérias é altamente resistente a este composto. Meios seletivos como placas de ágar de sangue com adição de telurito, como o meio de ágar de Hoyle e o meio de ágar de Clauberg, são recomendadas, apesar de estudos recentes revelarem que a triagem inicial padrão com meio seletivo de telurito para identificação de bacilos da difteria pode levar a resultados falso-negativos devido a diferenças significativas no nível de resistência a telurito de cepas de *C. diphtheriae* independente de origem, biótipo ou status de toxigenicidade. O meio de Tinsdale pode ser usado para direcionar a identificação de espécies do Complexo *C. diphtheriae*, uma vez que maioria das espécies portadoras do gene *tox* cresce bem no meio de Tinsdale, produzindo colônias pretas com um halo preto ao redor de cada colônia. Isso se deve à capacidade de produzir cistinase na presença de telurito, cistina e tiosulfato, resultando em depósitos de telúrio preto observados no ágar. Outras espécies de *Corynebacterium* podem ou não ser capazes de crescer na presença de telurito, mas se forem capazes de crescer, terão pequenas colônias bege ou acastanhadas que não exibem halos pretos. Entretanto, recentemente, Bernard e colaboradores (2021), propuseram uma nova espécie de *Corynebacterium*, *C. hindlerae* sp. nov., um isolado incomum não portador de gene *tox*, recuperado de um granuloma de pulso humano, que produziu colônias pretas com halos pretos em ágar Tinsdale, mas era distinguível de espécies de *Corynebacterium* que podem conter genes de *tox*. Logo, o crescimento neste meio é presuntivo e não confirmatório (EFSTRATIOU; MAPLE, 1994; SANTOS et al., 2015; BERNARD et al., 2021).

Para corinebactérias lipofílicas 0,1-1,0% Tween 80 deve ser adicionado ao meio. Os testes básicos para identificação de *Corynebacteria* incluem coloração de Gram e morfologia celular, tamanho, pigmentação, odor e hemólise das colônias, reação CAMP (*Christie-Atkins-Munch-Peterson*), lipofilia, motilidade e testes bioquímicos como produção de catalase e pirazinamidase, redução de nitrato, hidrólise de uréia, hidrólise de esculina, produção de ácido

a partir de glicose, maltose, sacarose, amido, manitol e xilose. Comumente estes testes são insuficientes para a identificação completa, principalmente no caso de infecções oportunistas. Por esta razão, no caso de detecção de *Corynebacterium* spp. em amostras clínicas normalmente estéreis (como amostras de sangue), se o microrganismo foi recuperado de mais de uma das múltiplas amostras colhidas tornando-se positivas, deve ser enviada ao laboratório de referência para confirmação (EFSTRATIOU; MAPLE, 1994; VERSALOVIC, 2011).

Quando espécies potencialmente toxigenicas de *Corynebacterium* são detectadas, a produção de toxina pode ser investigada usando o teste Elek *in vitro* (convencional ou modificado), ensaios *in vitro* de citotoxicidade de células Vero ou teste *in vivo* em cobaias. No entanto, o teste de cobaias não é recomendado atualmente, pois de acordo com os regulamentos europeus (Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2010 sobre a proteção de animais usados para fins científicos) o teste com animais não deve ser realizado quando um ensaio *in vitro* alternativo é desenvolvido (EFSTRATIOU; MAPLE, 1994; EFSTRATIOU et al., 1998).

Além disso, um teste imunoenzimático rápido e um teste de tira imunocromatográfica rápida foram desenvolvidos para a detecção fenotípica da TD entre isolados de corinebactérias e mostraram alta sensibilidade e especificidade (ENGLER; EFSTRATIOU 2000; ENGLER et al. 2002;)

Diversos sistemas de identificação baseados em testes bioquímicos foram desenvolvidos a fim de facilitar o diagnóstico laboratorial de infecções por *Corynebacterium*, como API Coryne (BioMerieux, França), Rapid CB Plus (Remel/ThermoFisher Scientific, EUA), BBL Crystal Gram-Positive Panel (Becton Dickinson, EUA) e MICRONAUT-RPO (Merlin Diagnostics, Alemanha). Em geral, os sistemas incluem painéis (tiras ou placas) com microtubos contendo substratos desidratados para reações bioquímicas. Uma suspensão de um isolado bacteriano é usada como inóculo que reidrata e inicia as reações de teste. Após a incubação do painel, cada microtubo de teste é examinado quanto à reatividade, observando o desenvolvimento de uma cor ou fluorescência. Em alguns casos, os reagentes devem ser adicionados aos microtubos de teste para proporcionar uma mudança de cor. O padrão resultante de escores de teste positivos e negativos é usado como base para a identificação do isolado por comparação dos resultados com os padrões de reatividade armazenados no banco de dados. Os sistemas apresentam limitações como necessidade de testes adicionais para algumas estirpes; dificuldade de leitura das reações de fermentação de carboidratos; necessidade de inóculos densos (nº 4 a 6 da escala McFarland) impossibilitando identificação diretamente das placas de crescimento primárias; identificação errônea devido ao limitado

número de entradas presentes no banco de dados de um sistema (FUNKE; PETERS; ARAVENA-ROMAN, 1998; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

Dificuldades adicionais podem surgir quando um isolado é de crescimento lento e relativamente inerte bioquimicamente, sendo difícil obter inóculo suficiente deste isolado para teste, podendo resultar em reações bioquímicas fracas que são difíceis de discriminar (ADDERSON et al., 2008).

A descrição de novas espécies por meio da taxonomia através de técnicas bioquímicas e moleculares tem permitido a reclassificação de diversas espécies, o que vem aumentando a discriminação entre os microrganismos envolvidos em processos infecciosos e aqueles pertencentes aos membros da microbiota anfibiótica humana. A introdução da Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção à Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS, do inglês “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”), particularmente, forneceu a determinação de espécies de *Corynebacterium* com suficiente precisão usando bancos de dados aprimorados e pontuações de corte mais baixas na análise de espectrometria de massa (MITCHELL et al., 2021; RASMUSSEN et al., 2020).

A aplicação do sequenciamento metagenômico possibilita a investigação da composição da comunidade de maneira imparcial, permitindo uma detecção mais rápida e a descoberta de novas espécies, além de reduzir a dependência das culturas microbianas (KNIGHTS et al., 2011, LOMAN et al., 2013; PAVIA, 2011; VENKATESAN et al., 2013).

O potencial de aplicação dessas tecnologias para melhorar o diagnóstico tem sido amplamente reconhecido e há um extenso trabalho em andamento para superar os desafios associados ao uso clínico dessas tecnologias. (BLAUWKAMP et al., 2019; CHIU; MILLER, 2019, MILLER et al., 2013; 2019).

## **1.5 Multirresistência bacteriana**

A resistência a múltiplas drogas é definida como a ausência de sensibilidade ao menos a um antibiótico de três ou mais classes, podendo afetar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MAGIORAKOS et al., 2012). Estes microrganismos possuem elevada capacidade de se disseminar tanto em ambientes hospitalares como comunitários (OLIVER et al., 2015; OTEO et al., 2015).

Os mecanismos de resistência bacterianos evoluíram rapidamente, devido à presença de pressões seletivas, proporcionando uma vantagem competitiva para as estirpes que os possuem. Os artifícios de defesa contra os antimicrobianos são diversos e envolvem desde a produção de enzimas desativadoras de antimicrobianos, como as diversas classes de beta-lactamases ou enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, até mudanças nos alvos dos antimicrobianos e redução da concentração intracelular de antimicrobianos, seja pela limitação da entrada do antibiótico ou facilitando sua expulsão. O emprego de doses subótimas de antimicrobianos em concentrações incapazes de eliminar o patógeno favorecem a seleção gradual da resistência. Os genes de resistência podem estar presentes no cromossomo, e cada vez mais, em elementos extracromossômicos transmissíveis como plasmídeos e transposons (KAKOULLIS et al., 2021; LAXMINARAYAN et al., 2013).

Estudos propõem o papel dos plasmídeos na patogenicidade de doenças causadas por bactérias pertencentes à microbiota, uma vez que algumas bactérias podem estar presentes tanto em pessoas assintomáticas quanto naquelas com sintomas (MONTELONGO HERNANDEZ; PUTONTI; WOLFE, 2021). No caso, especificamente, do urobioma, os plasmídeos bacterianos são um componente significativo deste ecossistema e são bem descritos em enterobactérias, como a *E. coli*, em relação a outras espécies causadoras de ITU (BROLUND et al., 2013).

Além do crescente isolamento dos BGPI em diversas infecções, o aparecimento de amostras com perfis MDR é um fator contribuinte para o aumento do interesse por esse grupo de microrganismos (QIN et al., 2017; RAMOS et al., 2019; WANG et al., 2016).

### 1.5.1 Produção de Beta-lactamases

A classe dos beta-lactâmicos, é a mais amplamente empregada no tratamento de infecções bacterianas e compreende as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, e é comumente utilizada pela sua eficiência e segurança em virtude de sua alta toxicidade seletiva (CHANT; LEUNG; FRIEDRICH, 2013; MURRAY et al., 2004; SANTOS et al., 2020). Os carbapenêmicos se apresentam como terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para aquelas infecções causadas por microrganismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas por possuírem amplo espectro de atividade. (GALES et al., 2002).



Existem vários mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, sendo o mais comum e importante a expressão de beta-lactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico, impedindo que o antimicrobiano apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (BUSH, 1988; JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005; LIVERMORE, 1995; ROSSOLINI, 2005). Em cepas de *C. striatum*, o gene *bla* codifica a beta-lactamase classe A e é responsável pela resistência à penicilina, enquanto os genes *ampC*, amplamente distribuídos entre os gêneros da família *Enterobacteriaceae*, codificam a beta-lactamase classe C, responsável pela resistência à cefotaxima (ALIBI et al., 2017).

As beta-lactamases foram classificadas por Ambler (1980) pela sequência de proteínas em quatro classes, A, B, C e D, e também podem ser diferenciadas por seus mecanismos catalíticos, podendo ser serina-beta-lactamases (classes A, C e D de Ambler), aquelas com serina em seu sítio ativo, ou metalo-beta-lactamases (MBL), pertencentes à classe B de Ambler, aquelas com pelo menos um átomo de zinco em seu sítio ativo. As enzimas classificadas como classe A, hidrolisam penicilinas e cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos; não são inibidas pelo EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), apenas parcialmente pelo ácido clavulânico ou tazobactam. As de classe C atuam sobre as cefalosporinas e a classe D possui oxacilinasas (OXAs) que podem ter ação de carbapenemase. As que são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos pertencem às classes A (penicilinasas), B (metalo-beta-lactamases) e D (OXAs) segundo Ambler (1980) (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; DJAHMI et al., 2014; HARRIS; TAMBYAH; PATERSON, 2015; MOOSAVIAN; RAHIMZADEH, 2015; POIREL et al., 2004; POIREL; NORDMANN, 2002; RASMUSSEN; BUSH; 1997; ROSSOLINI, 2005).

As carbapenemases classe A reportadas na literatura podem ser codificadas por genes de origem cromossomial (*NmcA*, *SME*, *IMI-1*, *SFC-1*), ou plasmidial (*KPC*, *IMI-2*, *GES*). A primeira *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) foi isolada de um caso clínico de *K. pneumoniae* em 1996 na Carolina do Norte, Estados Unidos, sendo associada a um plasmídeo não conjugativo. Os genes *bla*<sub>KPC</sub>, que codificam esta enzima, estão localizados em sua maioria no transposon *Tn4401*, sendo este comumente associado ao *Tn1331*, o qual contém os genes *bla*<sub>OXA-9</sub> e *bla*<sub>TEM-1</sub>. Assim, por ser um gene encontrado em um elemento móvel, é facilmente transferido entre diferentes bactérias (ANDRADE, 2011; AREND, 2014; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; NAAS et al., 2008; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; YIGIT et al., 2001). Diversas variantes de KPC foram descritas no mundo, sendo isoladas de *K. pneumoniae* e outras enterobactérias: *E. coli*, *K. oxytoca*, *Enterobacter spp*, *Salmonella spp*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp*. Entretanto, há relatos da identificação dessa enzima em não

fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (FIGUEIRAL; FARIA, 2015; HIRSCH; TAM, 2010; JÁCOME et al., 2012; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; QUEENAN; BUSH, 2007; ROBLEDO et al., 2010; THOMSON, 2010; VILLEGAS et al., 2007).

As beta-lactamases de classe C são amplamente distribuídas entre as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, sendo ativas contra penicilinas e, especialmente, contra cefalosporinas de 3ª geração (como a ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima). Estas enzimas podem hidrolisar inibidores beta-lactâmicos (como o ácido clavulânico e o tazobactam), cefamicinas (como a cefoxitina e o cefotetan) e monobactâmicos (como o aztreonam) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BUSH et al., 1993; JACOBY, 2009; KAZMIERCZAK et al.; 1990; MONNAIE; FRERE, 1993). Carbapenêmicos podem ser usados para tratar infecções causadas por bactérias produtoras de ampC, mas a resistência pode surgir em alguns organismos devido a mutações que reduzem o influxo (perda de porina da membrana externa) ou aumentam efluxo (ativação da bomba de efluxo) (JACOBY, 2009). Estas enzimas podem ser cromossômicas ou plasmidiais. Quando cromossômicas, podem ser não-indutíveis, indutíveis, constitutivas com sobre- ou hiper-expressão. Em *E. coli*, a regulação da expressão cromossômica de ampC difere significativamente da de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Em *E. coli*, a ampC é regulada por um promotor fraco e um atenuador forte, resultando em uma expressão constitutiva de ampC de baixo nível. Diversas mutações na região do promotor *ampC* levando à superexpressão foram descritas (FORWARD et al., 2001; MULVEY et al., 2005; TRACZ et al., 2005). Não fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa*, também produzem enzimas ampC induzíveis homólogas àquelas observadas em *Enterobacteriaceae* (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006; HARRIS; TAMBYAH; PATERSON, 2015; JACOBY, 2009; LODGE et al., 1990). Os genes *ampC*, que codificam essas enzimas, tem sido cada vez mais transferidos entre espécies via plasmídeos. A primeira cefamicinase transmissível (CMY-1) foi identificada em um isolado de *K. pneumoniae* de um paciente na Coréia do Sul em 1989 (BAUERNFEIND; SCHWEIGHART; CHONG, 1989). A ampC mediada por plasmídeo está se tornando cada vez mais comum como causa de resistência em *Klebsiella* spp. e *E. coli* (ALVAREZ, et al., 2004; FREITAS et al., 2014; REULAND et al., 2014; SIDJABAT et al., 2014).

As carbapenemases da classe D ou OXAs podem ser capazes de hidrolisar oxacilina ou cloxacilina e carbapenêmicos como é o caso de OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA 27, em especial, OXA-48; ou serem apenas ESBL, não apresentando capacidade de hidrolisar carbapenêmicos. Essas serina-carbapenemases podem ou não ser inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, porém não são inibidas pelo EDTA. A resistência aos carbapenêmicos parece

decorrer do conjunto da ação das OXAs e da impermeabilidade da membrana e/ou bomba de efluxo dos antimicrobianos (AMBLER, 1980; AREND, 2014; BUSH; JACOBY, 2010; DJAHMI et al., 2014; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007).

As MBL são caracterizadas por hidrolisar todos os beta-lactâmicos disponíveis comercialmente, com exceção do aztreonam. (BUSH, 1998; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; ELIOPOULOS; BUSH, 2001). Estas enzimas podem ser codificadas cromossomicamente, como as MBL produzidas intrinsecamente por *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus anthracis* (CHEN et al., 2003; PAYNE et al., 1994; WALSH et al., 2005) ou transmitidas através de elementos genéticos móveis como as de *Bacteroides fragilis* (YAMAZOE et al., 1999). A identificação genotípica pode ser realizada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase chain reaction* – PCR) a fim de se confirmar a presença e origem dos principais genes responsáveis pela resistência (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*) (WALSH et al., 2005).

#### 1.5.2 Mecanismos de Resistência descritos em *Corynebacterium* spp.

Estudos apontam que diferentes espécies de *Corynebacterium* podem apresentar resistência antimicrobiana a diferentes compostos químicos, geralmente associada a elementos genéticos extracromossômicos envolvidos na transmissão de genes de resistência tanto em cepas patogênicas quanto potencialmente patogênicas (ADDERSON et al., 2008; FERNANDEZ-ROBLAS et al., 2009).

No gênero *Corynebacterium*, a resistência a fluoroquinolonas e daptomicina são exemplos de um mecanismo intrínseco associado a mutações pontuais nos genes *gyrA* e *pgsA2*, respectivamente (GOLDNER et al., 2018; OLENDER et al., 2012). Por outro lado, a presença de plasmídeos em *Corynebacterium* spp., embora rara, está associada à presença de genes de resistência antimicrobiana (*Antimicrobial Resistance Genes* - ARGs) (OLIVEIRA et al., 2017; SCHRÖDER et al., 2012; TAUCH et al., 2003)

A presença e diversidade de sequências de inserção sugerem um papel essencial na expressão de ARGs em rearranjos genômicos e seu potencial para transferir esses elementos para outros patógenos (LEYTON et al., 2021). Em corinebactérias, diferentes ARGs associados a elementos genéticos móveis, incluindo plasmídeos, integrons, sequências de inserção e

transposons, foram relatados (HENNART et al., 2020; NEŠVERA; HOCHMANNOVÁ; PÁTEK, 1998; OLENDER et al., 2012; TAUCH et al., 2003).

Em *C. striatum*, por exemplo, o grupo de genes relacionados a resistência antimicrobiana, também chamado de resistoma, é composto tanto por elementos cromossômicos quanto adquiridos, sendo determinada principalmente por transposons, sequências de inserção e plasmídeos. A resistência às fluoroquinolonas e à daptomicina deve-se a mutações nos genes cromossômicos, já a resistência a macrolídeos, tetraciclina, cloranfenicol, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos está associada a elementos genômicos móveis, como plasmídeos e transposons. A crescente resistência e adaptação à tolerância à daptomicina merece atenção especial, o que requer maior monitoramento de sua presença e dos mecanismos que a produzem (LEYTON et al., 2021).

Uma região de 38-66 kb foi encontrada entre os genes cromossômicos *dppD* e *cgrA/B* em *C. striatum* contendo todos os elementos móveis com seus ARGs associados, e esta região é provavelmente um ponto de acesso ao cromossomo para vetores de transferência horizontal, como plasmídeos (NUDEL et al., 2018). Dos três plasmídeos conhecidos em *C. striatum* (pCs-Na-1, pCs-Na-2 e pTP10), apenas pTP10 é conhecido por conferir resistência, sendo um mosaico MDR relatado em 1983 na cepa *C. striatum* M82B inicialmente mal caracterizada como *C. xerosis*, conferindo resistência a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e estreptomicina (KONO; SASATSU; AOKI, 1983; OLIVEIRA et al., 2017).

O fenótipo de resistência concomitante a Macrolídeos, Lincosamidas, Estreptogramina está associado ao gene *erm(X)* transportado pelo transposon Tn5432 e é um mecanismo frequentemente observado em estafilococos coagulase-negativos (SZEMRAJ et al., 2019; SZEMRAJ; KWASZEWSKA; SZEWCZYK, 2018; TAUCH et al., 2000). Entretanto, tem sido observado em corinebactérias de importância clínica, como *C. diphtheriae*, *C. xerosis*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. urealyticum* e *C. striatum* (COYLE et al., 1979; EADY et al., 2000; GUIRAO et al., 2005; LEYTON et al., 2021; OLENDER; NIEMCEWICZ, 2010; ROSATO; LEE; NASH, 2001). As sequências de inserção que compõem este transposon foram identificadas em outras bactérias e em isolados em todo o mundo exibindo algumas semelhanças no contexto genômico de sequências de inserção, mas apresentando alguma diversidade de composição gênica e rearranjos nessas regiões. Isso sugere que as sequências de inserção são potenciais propagadoras de resistência no nível interespecies e desempenham um papel fundamental na formação e evolução contínua do resistoma (LEYTON et al., 2021).

O gene *sul* confere resistência ao sulfametoxazol e o gene *qacEdelta1* a compostos de quaternários de amônio e são frequentemente vistos em integrons de classe 1 (SOUZA et al., 2020; WANG et al., 2019). Embora integrons sejam considerados escassos em bactérias Gram-positivas, integrons de classe 1 já foram documentados em espécies de *Corynebacterium*, como *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes* e *Corynebacterium casei* e, recentemente, em isolados clínicos de urina caracterizados como *Corynebacterium* spp. (DENG et al., 2015; ROCHA et al., 2020). Além disso, de acordo com o banco de dados INTEGRALL, no gênero *Corynebacterium*, há integrons de classe 1 em *C. diphtheriae*, *C. amycolatum* e *Corynebacterium efficiens* (MOURA et al., 2009).

Embora genes como *qacEdelta1*, *sul*, *bla* e *merA* não tenham sido associados a elementos genéticos móveis em *C. striatum*, considerando sua ocorrência em outras bactérias, eles podem fazer parte de integrons ou outras ilhas genômicas. Além disso, genes que conferem resistência à vancomicina e linezolida não foram verificados entre cepas nosocomiais e comunitárias de *C. striatum*, mas o surgimento de cepas MDR e atuando como reservatório para ARGs revela um cenário preocupante de saúde pública e reforça a necessidade da implementação de programas de vigilância genômica e estudos sobre os mecanismos de resistência aos antimicrobianos (LEYTON et al., 2021).

## 1.6 Virulência bacteriana

A patogenicidade bacteriana na ITU é decorrente da interação entre fatores de resistência do hospedeiro como a resposta imune, fatores genéticos e estruturais, e fatores inerentes ao uropatógeno, o que determinará a gravidade da infecção urinária e a forma de acometimento clínico. Os fatores que fazem com que as bactérias consigam evitar mecanismos de defesa do hospedeiro são conhecidos como fatores de virulência e são bem elucidados para a enterobactérias. Estas se caracterizam pela presença ou não de estruturas como flagelo contendo o antígeno “H”, responsável pela motilidade da bactéria; antígeno “K” presente na cápsula, que confere resistência à fagocitose; antígeno “O” presente na membrana externa da bactéria, que são determinantes antigênicos de anticorpos específicos sendo, portanto, úteis na tipagem sorológica (150 antígenos definidos) e na discriminação entre relapso (recorrência causada pela mesma cepa ou dentro de 2 semanas do término da infecção original) e reinfeção (recorrência causada por diferente cepa da bactéria que causou a infecção original). Há ainda

estruturas denominadas fímbrias (*pili*) responsáveis pela adesão da bactéria ao urotélio e transmissão de informação genética a outras bactérias via ácido desoxirribonucleico (Desoxirribonucleic Acid – DNA) dos plasmídeos (HEILBERG; SCHOR, 2003; SILVEIRA et al., 2010).

A TD é uma das toxinas bacterianas mais bem investigadas e o principal fator de virulência das cepas toxigênicas de *Corynebacterium* spp. (WEERASEKERA et al., 2019). Entretanto outros mecanismos parecem desempenhar um papel importante na patogenicidade de cepas de *Corynebacterium* spp. produtoras e não produtoras de TD.

### 1.6.1 Aderência bacteriana

Os microrganismos possuem diferentes adesinas em sua superfície, proteínas que medeiam a ligação a receptores e propiciam a colonização de superfícies. Para as bactérias patogênicas, essas adesinas são fundamentais para os estágios iniciais da infecção, pois permitem o contato com as células hospedeiras e a colonização de diferentes tecidos. Essas proteínas reconhecem receptores específicos expressos em células hospedeiras. Assim, o repertório de adesinas expressas por um microrganismo 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 as bactérias permanecem no meio extracelular ou se internalizam, influenciando na capacidade de sobrevivência e replicação do microrganismo no interior da célula invadida. O processo de adesão bacteriana às células hospedeiras foi primeiramente elucidado por meio de pesquisas com *E. coli*, em que foi demonstrado que essa espécie, via *pili* multiméricos, podiam hemaglutinar células animais (KLINE et al., 2009; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006).

Sabe-se que *C. diphtheriae* apresenta afinidade preferencialmente por mucosas e pele como sítios de colonização. Aspectos como hidrofobicidade, presença de estruturas de aspectos fimbriais e capacidade de aglutinar hemácias humanas e de animais parecem ser importantes no mecanismo de aderência deste microrganismo (GOMES, 2007; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1992; MATTOS-GUARALDI et al, 1999; VENGADESAN; NARAYANA, 2011; YANAGAWA; HONDA, 1976). As corinebactérias apresentam uma rica variedade de lipoglicanos, como lipoarabinomananas (LAM) e lipomananas (LM) (BRENNAN; NIKAIDO,

1995). Foi demonstrado que cepas de *C. diphtheriae* responsáveis por causar endocardite mostravam padrões de aderência em células de linhagem epitelial de faringe humana (HEp-2), mediada por um lipoglicano chamado CdiLAM, uma nova variante de LAM (HIRATA JR. et al., 2008; MOREIRA; MATTOS-GUARALDI; ANDRADE; 2008). *C. diphtheriae* também possui uma proteína associada à superfície, DIP1281 que parece estar relacionada com a organização da camada proteica externa (OTT et al., 2010). A avaliação de uma outra proteína, a DIP0733, com base em experimentos *in vitro*, sugeriu que esta pode estar envolvida na adesão, invasão de células epiteliais e indução de apoptose. Uma cepa mutante mostrou um padrão de adesão alterado e uma capacidade drasticamente reduzida de aderir e invadir células epiteliais. Experimentos subsequentes mostraram uma influência de DIP0733 na ligação de *C. diphtheriae* a proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina. Além disso, com base em sua atividade de ligação ao fibrinogênio, o DIP0733 pode desempenhar um papel na prevenção do reconhecimento de *C. diphtheriae* pelo sistema imunológico (ANTUNES et al., 2016).

As adesinas bacterianas atuam no reconhecimento e colonização das superfícies, seja pela ativação de estruturas como *hair-like* denominadas *pili* ou fímbrias, ou identificadas como adesinas não *pilus*, quando relacionadas com a superfície celular microbiana (SOTO; HULTGREN, 1999). As bactérias Gram-positivas possuem várias proteínas de superfície ancoradas na parede celular através de um mecanismo dependente de sortase, sendo as sortase de classe II as mais frequentes em corinebactérias, estreptococos e enterococos (COSSART; JONQUIÈRES, 2000; TON-THAT; MARRAFFINI; SCHNEEWIND, 2004). A molécula *pili* em bactérias Gram-positivas foi primeiramente descrita em 1967 com um estudo de 45 cepas de *Corynebacterium renale*, em que as fibrilas avaliadas com base em análises morfológicas de quantidade e comprimento por meio de microscopia eletrônica, apresentaram grande semelhança com as estruturas da proteína do *pili*, previamente descritas em bactérias Gram-negativas (YANAGAWA; OTSUKI; TOKUI, 1968).

Trost e colaboradores (2010) afirmaram que existem agrupamentos de genes que codificam genes de sortases relacionados à síntese de *pili* adesivo de *C. pseudotuberculosis* FRC41. As estruturas de *pili* são compostas pelas subunidades principais, SpaA e SpaD; subunidades menores, SpaB e SpaE; e subunidades apicais, SpaC, SpaF. Uma estrutura de *pilus* completa ou mesmo as subunidades podem realizar um contato inicial com os receptores da célula hospedeira facilitando a entrega de fatores de virulência. *C. pseudotuberculosis* FRC41 apresenta uma sortase de limpeza (*srtD*), responsável pela ancoragem do *pili* à parede celular e localizada em outra região do genoma (TROST et al., 2010). Ton-That e Schneewind (2003), observaram que a cepa *C. diphtheriae* NCTC 13129 também apresenta regiões de *pili* e três

agrupamentos de pili: SpaA, subunidade principal; SpaB, subunidade menor; e, SpaC, como uma subunidade da ponta do *pilus*. Em 2006, foram caracterizados um segundo e terceiro *pilus*, no qual o segundo cluster de *pilus* foi identificado como apresentando uma subunidade principal (SpaD) e subunidade de *pilus* menor (SpaE e SpaF), e o terceiro cluster de *pilus* contém uma subunidade principal (SpaH) e duas subunidades de *pili* menores (SpaG e SpaI) (GASPAR; TON-THAT, 2006). Além disso, o comprimento do filamento é diretamente proporcional à abundância do *pilus* SpaH (SWIERCZYNSKI; TON-THAT, 2006).

### 1.6.2 Biofilmes bacterianos

A formação de biofilmes em diferentes tipos de superfície constitui atividade importante para a evasão dos microrganismos da atividade antimicrobiana de alguns agentes quimioterápicos e da resposta imunológica. Infecções associadas a biofilmes bacterianos são comumente relacionadas a dispositivos médicos, como cateteres, articulações artificiais, válvulas cardíacas, próteses e lentes de contato (BECEIRO et al., 2013; NAGATA et al., 2004).

O estabelecimento de um biofilme envolve a transição de um estilo de vida planctônico para um sésil, estando ligado a uma superfície. A colonização se inicia com uma adesão reversível de uma ou algumas células à superfície, podendo ou não se tornar irreversível. Esse primeiro contato com a superfície é instável e ocorre através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Para as bactérias que possuem flagelos essa etapa é mediada por este apêndice. Além disso, *pili* (como tipo I e tipo IV), fímbrias *curli* e antígeno 43 demonstraram mediar a fixação. Já as bactérias Gram-positivas imóveis apresentaram contato superficial via *pili* e adesinas, como SagA e Acm de *Enterococcus faecium*, e Ace, Esp e Ebp de *Enterococcus faecalis* (KOSTAKIOTI et al., 2013).

A partir de observações microscópicas é possível sugerir que, as células uma vez irreversivelmente ligadas deixam de se mover e começam a secretar substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular polymeric substances* - EPS) compostas por proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos. O EPS é uma matriz viscosa que promove a adesão das células à superfície e umas às outras, além de fornecer proteção física às bactérias (COSTERTON et al., 1999; FLEMMING et al., 2016). As células aderidas irreversivelmente, encontrando condições favoráveis para o crescimento, começam a se multiplicar formando



microcolônias, que se desenvolverão em um biofilme maduro (KOSTAKIOTI et al., 2013; WEBB, 2007).

Alguns fatores podem dificultar ou impedir o crescimento do biofilme enquanto ele amadurece, como escassez de nutrientes ou diminuição dos níveis de oxigênio, o que pode desencadear a dispersão de células do biofilme, que eventualmente poderão se aderir a uma nova superfície e iniciar um novo ciclo de vida sésil (PETROVA; SAUER, 2016).

Embora haja o conhecimento de que a maioria das espécies bacterianas sejam capazes de produzir biofilmes, as informações mais detalhadas sobre o ciclo de vida e desenvolvimento de biofilme advêm do estudo de *P. aeruginosa*. Foi observado um processo sequencial e altamente regulado, envolvendo pelo menos cinco estágios fenotipicamente distintos, cada um correspondendo a padrões únicos de produção de proteínas e expressão gênica. A perda da expressão do gene do flagelo, a produção de componentes do EPS, indução de mecanismos de resistência a antimicrobianos (incluindo bombas de efluxo mesmo quando os biofilmes foram cultivados em ausência de antimicrobianos) e aumento dos níveis de determinantes da virulência foram as principais características observadas no modo sésil de crescimento (RUMBAUGH; SAUER, 2020).

A organização em biofilme protege os microrganismos da fagocitose e da ativação do complemento. Além disso, a secreção de anticorpos opsonizantes e a produção de peróxido de hidrogênio são ineficazes, uma vez que não conseguem penetrar no biofilme devido à presença do EPS, que evita a passagem e a ação destas moléculas (COSTERTON et al., 1999; FUX et al., 2005; SMITH, 2005; STEWART et al., 2000; ZIMMERLI et al., 2004).

Uma maior resistência antimicrobiana de microrganismos em biofilmes pode ser explicada pelo fato de que bactérias em biofilmes são cercadas pelo EPS que possui uma arquitetura geralmente estável que fisicamente pode restringir a penetração e a difusão de agentes antimicrobianos, impedindo que se atinja a concentração adequada nos tecidos do hospedeiro e no ambiente intracelular. Outra possibilidade seria que, por ser de natureza aniônica, o EPS reagiria com os antimicrobianos, podendo inclusive adsorvê-los (PATEL, 2005; SMITH, 2005).

Outro fator a ser considerado é que há uma grande produção de enzimas que inativam antimicrobianos, como a beta-lactamase, em biofilmes de *P. aeruginosa* (BAGGÉ et al, 2000). Assim, o acúmulo destas moléculas dentro da matriz produziria gradientes de concentração que protegeriam células bacterianas subjacentes. Além disso, a diminuição não só da quantidade de nutrientes como também da concentração de oxigênio, juntamente com o acúmulo de resíduos dentro do biofilme podem fazer com que algumas células bacterianas entrem na fase

estacionária de crescimento. Nesta fase, os microrganismos estão menos suscetíveis à ação de agentes quimioterápicos que dependem do crescimento bacteriano (PATEL, 2005).

Espécies de *Corynebacterium* já demonstraram ser capazes de produzir biofilmes em superfícies abióticas, conferindo a esses microrganismos vantagens no estabelecimento de uma infecção (FROLOVA; KHARSEYEVA; MIRONOV, 2014; GOMES et al., 2013; KANG et al., 2018, KWASZEWSKA et al., 2006; LEAL et al., 2016; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; QIN et al., 2017; SOUZA, C. et al., 2015; SOUZA, M. et al., 2015).

Gomes e colaboradores (2009) relataram o desenvolvimento de biofilme por uma cepa não tóxica de *C. diphtheriae* na superfície do cateter de poliuretano em um paciente com câncer. Os estudos *in vitro* sobre o biofilme mostraram baixa capacidade da cepa *C. diphtheriae* em desenvolver biofilmes em poliestireno e maior capacidade de aderência na superfície do vidro. Esta cepa também mostrou agregação e aderência à superfície das células HEp-2.

A capacidade de formação de biofilme por cepas de *C. amycolatum* foi demonstrada por Toribio e colaboradores (2018) ao compararem a adesão de corinebactérias a diferentes materiais oculoplásticos. A contagem UFC por mL foi estatisticamente maior no Polietileno Poroso de Alta Densidade (*High Density Porous Poliethilen* - HDPP) em comparação com silicone de implantes orbitais. *C. amycolatum* apesar de apresentar baixa taxa de adesão ao HDPP, teve alta taxa de crescimento e foi capaz de desenvolver um biofilme denso e maduro.

Por vezes, a administração de antimicrobianos é ineficaz uma vez que esses microrganismos apresentam cepas MDR. Além do que, estudos já observaram que antimicrobianos não destroem o biofilme bacteriano quando aplicados em concentração menor ou igual a concentração inibitória mínima (BRIDIER et al., 2011; CAMPANILE et al., 2009; GOMES et al., 2013).

Em um estudo realizado por Olender e colaboradores (2018) uma dose menor que a necessária de ciprofloxacina para a destruição *in vitro* do biofilme produzido por *C. striatum* causou um aumento de bactérias vivas dentro do biofilme, sugerindo que o uso de baixas doses de antimicrobianos favoreceria a permanência e crescimento do biofilme. Além disso, por consequência, poderia promover a liberação de bactérias planctônicas da estrutura do biofilme, levando a disseminação na corrente sanguínea ou nos tecidos vizinhos.

### 1.6.3 Toxicidade de *Corynebacterium* spp.

Além da TD produzida pelas cepas do recém denominado complexo *C. diphtheriae*, a toxina fosfolipase D (*Phospholipase D* - PLD) parece atuar como um fator de virulência de algumas espécies do gênero *Corynebacterium*, como *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*. Codificada pelo gene *pld*, esta toxina tem sido apontada como um importante fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, facilitando o processo de disseminação e infiltração nos tecidos do hospedeiro (HODGSON et al., 1992). A exotoxina PLD está implicada na disseminação da bactéria da área original da infecção para outros órgãos, através da hidrólise da esfingomiéline dos tecidos e membranas celulares do hospedeiro. A importância da exotoxina PLD na relação hospedeiro-patógeno pode ser compreendida pela observação de que anticorpos anti-PLD podem inibir a disseminação bacteriana no hospedeiro e está relacionado à proteção induzida pela vacinação (ROSE et al., 2002; MOURA-COSTA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2017; PÉPIN; BOISRAMÉ; MARLY, 1989).

A neuraminidase extracelular NanH, produzida por *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* e *C. belfantii* também se apresenta como um potencial fator de virulência (TROST et al., 2010, 2011; WEERASEKERA et al., 2019).

Estudos anteriores sugeriram que NanH é um importante fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, uma vez que participa do processo de adesão às células epiteliais do hospedeiro e auxilia na disseminação desta bactéria (BILLINGTON et al., 2002; SHEU et al., 2002). Outro estudo mais recente, utilizou rNanH para imunizar camundongos (G2), e obteve uma proteção significativa de 60%, confirmando o potencial desse antígeno vacinal (OLIVEIRA SILVA et al., 2020). No *Trypanosoma cruzi*, assim como em outros patógenos, uma extensa remodelação da superfície com sialoglicoconjugados, realizada por neuraminidases, impede o reconhecimento imunológico. Este mecanismo protege o *T. cruzi* das respostas imunes inatas e facilita a invasão intracelular das células hospedeiras (VIMR; LICHTENSTEIGER, 2002).

### 1.6.4 Sobrevivência no interior de macrófagos

No interior dos macrófagos, as bactérias estão expostas a substâncias que causam

estresse e afetar seu metabolismo. O meio intracelular pode ser alterado por uma superfície nitrosativa, choque osmótico oxidativo/térmico e privação de alimento que irão desencadear o mecanismo de sobrevivência da bactéria (KAZMIERCZAK; WIEDMANN; BOOR, 2005).

*C. pseudotuberculosis*, apresenta uma superfície lipídica associada à patogenicidade e virulência. Foi observado que a toxicidade do lipídio extraído dessa superfície pode causar uma alta suscetibilidade aos macrófagos peritoneais de camundongos, devido à sua ação necrosante, enquanto que esse mesmo efeito citotóxico não foi observado em macrófagos de coelhos (HARD, 1975). O perfil transcricional de *C. pseudotuberculosis* 1002 em relação aos estresses osmóticos ácidos e de choque térmico também foi analisado e os genes expressos de forma mais relevante foram relacionados ao processo de adesão, resposta ao estresse e oxirredução, onde os genes envolvidos na capacidade de virulência foram afetados. No processo de adesão, o gene *Cp1002\_0988*, um dos três genes que compõem este mecanismo, foi muito relevante sob estresse osmótico por estar localizado dentro de uma das ilhas de patogenicidade previstas para *C. pseudotuberculosis* 1002. Em relação aos genes que constituíram os processos de oxirredução celular, alguns genes apresentavam funções relacionadas à persistência bacteriana neste ambiente. Alguns genes estão envolvidos tanto na adesão quanto na oxirredução e foram de fundamental importância devido à relevância na virulência (PINTO et al., 2014).

A resposta ao estresse osmótico de *C. glutamicum* foi analisada e foi demonstrado que a bactéria pode adaptar seu metabolismo de acordo com as condições adversas, ou seja, a osmolaridade só pode afetar as células se houver variação neste coeficiente. Além disso, a produção de lisina aumentou em baixas taxas de diluição e com o consumo de glicose (VARELA; BAEZ; AGOSIN, 2004). Em relação ao estresse oxidativo, os fluxos de carbono no metabolismo central de *C. glutamicum* foram afetados pela deleção da proteína reguladora *mcbR*, redirecionando a via das pentoses-fosfato para a glicólise em resposta à deleção. Além disso, a deleção resultou no aumento da piruvato desidrogenase (KRÖMER et al., 2008).

Smith e colaboradores (2009) avaliaram a atividade e regulação da captação de zinco regulada (*Zur*) em *C. diphtheriae*, e identificaram três genes cuja transcrição é reprimida por *Zur*: *cmrA*, *zrg* e *troA*. Também demonstraram que a transcrição do gene *zur* é feita por um promotor, que por sua vez é regulado pelo produto do gene *Zur*, sendo seu produto modulado pela presença de zinco no ambiente, indicando também a capacidade de *C. diphtheriae* de integrar diferentes sinais de uma variedade de metais para sobreviver.

## 1.7 Interações patógeno-hospedeiro

A patogênese é baseada em complexas interações hospedeiro-patógeno, algumas das quais são específicas para certas bactérias, enquanto outras são compartilhadas entre diferentes patógenos (DORAN et al., 2016). Vários modelos de interação patógeno-hospedeiro têm sido utilizados para avaliar a patogenicidade de patógenos, incluindo amebas, nematódeos, insetos e peixes. Dentre esses, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* tem sido amplamente utilizado e muitas vezes serve como modelo de via de infecção oral (DORER; ISBERG, 2006; KURZ; EWBANK, 2007; O'CALLAGHAN; VERGUNST, 2010; WATERFIELD et al., 2008).

### 1.7.1 Emprego do nematódeo *Caenorhabditis elegans* para avaliação da interação patógeno-hospedeiro

*Caenorhabditis elegans* é um pequeno nematódeo de vida livre que habita solos úmidos (BRENNER, 1974). Por ser um organismo simples e geneticamente tratável, tem sido utilizado como modelo hospedeiro para identificação de genes de virulência de patógenos, e também para identificar genes do hospedeiro que interagem com os microrganismos invasores. Em 1974, *C. elegans* foi introduzido como modelo animal para estudos biológicos para o desenvolvimento neural (BRENNER, 1974), mais tarde foi desenvolvido como um sistema modelo para interações patógeno-hospedeiro, tanto em relação à imunidade inata quanto à caracterização de fatores de virulência microbiana (CLARK; HODGKIN, 2014; SIFRI; BEGUN; AUSUBEL, 2005). Fácil manutenção, curto ciclo de vida, facilidade de cultivo, transparência, rápido tempo de geração e baixo custo são vantagens que este nematódeo apresenta como um modelo de interação patógeno-hospedeiro (HOPE, 1999; WEN et al., 2012).

*C. elegans* tem sido considerado como bom modelo em estudos com relação à patogênese de diversas bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens*, *Burkholderia* spp., como também bactérias Gram-positivas e até fungos (ABALLAY; YORGEY; AUSUBEL, 2000; EVANS et al., 2008; GARSIN et al., 2001; GIBSON et al., 2020; HERNANDO-ORTIZ et al., 2020; HUMMELL; KIRIENKO, 2020; LABROUSSE et al., 2000; MIR; BALAMURUGAN, 2019; NATARAJAN et al., 2020; ORTEGA-RIVEROS et al., 2017; SLINGER et al., 2019).

*C. elegans* foi previamente empregado como modelo de interação *in vivo* para a avaliação da patogênese de corinebactérias. Nematódeos infectados com diferentes cepas de corinebactérias, exibindo uma gama de propriedades de virulência, mostraram características diferentes na curva de mortalidade, refletindo as diferenças de virulência entre as linhagens. Antunes e colaboradores (2016) utilizaram este modelo para a caracterização da virulência em cepas de *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*. *C. glutamicum*, e uma espécie não patogênica isolada originalmente de uma amostra de solo, não conseguiu colonizar os nematódeos após 24 horas, sendo incapaz de persistir nestes. Por outro lado, todas as outras espécies patogênicas testadas foram capazes de colonizar e induzir a morte/eliminação de *C. elegans*. Este modelo também é bem estabelecido em estudos para a investigação de fatores de patogenicidade de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (ANTUNES et al., 2015; BROADWAY et al., 2013; OTT et al., 2012).

Os ensaios de interação utilizando *C. elegans* permitem a observação da sobrevivência do nematódeo bem como de alterações morfológicas que podem decorrer da infecção tais como deformidade da região anal (*Deformed anal region- Dar*), edema vulvar causado pela distensão intestinal, eclosão interna do ovo (*worm bagging*) e formação de estrela (*star formation*), decorrente de agregados de nematódeos grudados por suas caudas (ABALLAY; YORGEY; AUSUBEL, 2000; ANTUNES et al. 2016; GARSIN et al., 2001; HODGKIN et al. 2013; JAIN et al., 2009; MOSSER; MATIC; LEROY, 2011).

Souza e colaboradores (2019) realizaram a interação de *C. striatum* com o nematódeo *C. elegans* e concluíram que as mudanças morfológicas dos nematódeos e níveis de mortalidade foram variáveis independentemente do local de isolamento clínico, capacidade de formação de biofilme, e perfis MDR e clonalidade das cepas bacterianas, indicando diferentes potenciais de virulência a despeito destes fatores.

Embora o modelo de *C. elegans* seja amplamente empregado como interação *in vivo* para o estudo da patogenicidade de diversos microrganismos, incluindo os do gênero *Corynebacterium*, não há estudos específicos para *C. amycolatum*.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Com exceção de *C. diphtheriae*, agente etiológico da difteria clássica, o potencial patogênico dos microrganismos corineformes foi subestimado por muitos anos. Apesar do aumento considerável dos relatos de outras espécies de corinebactérias, tais como *C. amycolatum*, envolvidas em infecções humanas, os mecanismos de resistência e patogenicidade desses isolados ainda permanece pouco compreendida. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral realizar a análise de aspectos relacionados à resistência e virulência de cepas de *Corynebacterium amycolatum* apresentando diferentes perfis de sensibilidade oriundas de infecções do trato urinário humano. Para atender o objetivo geral deste trabalho, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- a) Analisar o perfil epidemiológico das infecções urinárias comunitárias causadas por *C. amycolatum*;
- b) avaliar os perfis de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das amostras clínicas de *C. amycolatum* isoladas de infecções urinárias comunitárias;
- c) detectar os genes *bla* e *ampC* responsáveis pela resistência aos beta-lactâmicos por meio da produção de beta-lactamases pela PCR;
- d) investigar aspectos relacionados à virulência das cepas previamente isoladas através da interação *in vivo* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*;
- e) avaliar aspectos relacionados à aderência das cepas previamente isoladas empregando o modelo *in vitro* de células HEp-2.

### 3 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram organizados nos seguintes artigos científicos:

**Artigo 1:** Gomes SWC, Sant'Anna LO, Heggendorrn LH, Schimidt DB, Longo LGA, Souza C, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Póvoa HCC., Santos LS. Community-acquired urinary tract infections in adults and children due to *Corynebacterium amycolatum*, including multidrug-resistant and *bla* gene positive strains. Aceito para publicação na revista *International Journal of Science & Research Methodology* (**Qualis A4**).

**Artigo 2:** Gomes SWC, Heggendorrn LH, Longo LGA, Sant'Anna LO, Ramos JN, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL, Póvoa HCC., Santos LS. Isolation of multidrug-resistant and potentially invasive strains of *Brevibacterium ravenburgense* and *Corynebacterium amycolatum* in association with *Escherichia coli* from a human urine sample (**Artigo em fase de submissão**).

**Artigo 3:** Gomes SWC, Heggendorrn LH, Sant'Anna LO, Ramos JN, Schimidt DB, Viana VG, Souza MC, Ferreira PMN, Mattos-Guaraldi AL, Santos LS, Póvoa HCC. Heterogenic virulence potential, influence of multidrug resistance and *bla* gene coding class A beta-lactamase of *Corynebacterium amycolatum* uropathogens during infection of *Caenorhabditis elegans*. (**Artigo em fase de submissão**).



### **3.1 Artigo 1: Infecções do trato urinário adquiridas na comunidade em adultos e crianças causadas por *Corynebacterium amycolatum*, incluindo cepas MDR e gene *bla* positivas**

*Corynebacterium amycolatum* tem sido cada vez mais relatado como agente etiológico de infecções hospitalares leves a graves. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre infecções adquiridas na comunidade e infecções hospitalares por *C. amycolatum* multidroga-resistentes (MDR), especialmente em países em desenvolvimento, incluindo a América do Sul. Neste estudo, cepas de *C. amycolatum* foram identificadas como agente etiológico de 38 casos de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade em pacientes, em sua maioria do sexo feminino, atendidos em uma unidade ambulatorial brasileira: 63,16% adultos (18 a  $\leq$  59 anos), 28,95% idosos ( $\geq$ 60 anos); 7,89% crianças (<18 anos). A maioria das cepas de *C. amycolatum* (n=28; 73,68%) expressou perfis MDR heterogêneos. Curiosamente, sete cepas *C. amycolatum* MDR apresentaram o gene *bla* que codifica a beta-lactamase classe A. Portanto, estudos adicionais devem ser realizados para definir a natureza clonal e disseminação de cepas *C. amycolatum* MDR em unidades ambulatoriais e hospitalares no Brasil.

## Community-Acquired Urinary Tract Infections In Adults And Children Due To *Corynebacterium Amycolatum*, Including Multidrug-Resistant And *Bla* Gene-Positive Strains

Sara W. C. Gomes<sup>1,2</sup>, Lincoln de O. Sant'Anna<sup>1</sup>, Lorraine H. Heggendorn<sup>1,2</sup>, Denise B. Schimidt<sup>1,2</sup>, Luís Guilherme de A. Longo<sup>3</sup>, Cassius de Souza<sup>1</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>4</sup>, Ana Luíza de Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>, Helvécio C. C. Póvoa<sup>2</sup>, Louisy S. dos Santos<sup>1\*</sup>

Author affiliations:

<sup>1</sup>Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/ Ministry of Health - FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/ UERJ, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ CEP 20551-030, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental and Applied Microbiology, Health Institute of Nova Friburgo, Federal Fluminense University, Brazil.

<sup>3</sup>Paulo Góes Microbiology Institute (IMPG), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

<sup>4</sup>Oswaldo Cruz Institute (IOC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.

### ABSTRACT

*Corynebacterium amycolatum* has been increasingly reported as an etiologic agent of mild to severe nosocomial infections. However, further studies concerning community-acquired and nosocomial infections due to multidrug-resistant (MDR) *C. amycolatum* remain necessary, especially in developing countries, including South America. In this study, *C. Amycolatum* strains were identified as etiologic agents of 38 cases of community-acquired urinary tract infections in patients, mostly female, attended at a Brazilian ambulatorial unit: 63.16% adults (18 to ≤ 59 years old), 28.95% elderly (≥60 years old); 7.89% children (<18 years old). Most of *C. amycolatum* strains (n=33, 86.84%) expressed heterogenic MDR profiles. Interestingly, seven MDR *C. amycolatum* strains presented the *bla* gene encoding class A beta-lactamase. Therefore, additional studies must be conducted to define the clonal nature and dissemination of MDR *C. amycolatum* strains in community and hospital environment units in Brazil.

**Keywords:** beta-lactamase, *Corynebacterium amycolatum*, multidrug resistance, urinary tract infection

### INTRODUCTION

Non-diphtheria toxin (DT)-producing *Corynebacterium* spp. have been increasingly related to different types of human infections in both immunocompetent and immunocompromised individuals. Cases of severe infections and nosocomial outbreaks due to multidrug-resistant (MDR) strains have been reported in industrialized and developing countries. Clinical relevance has been also recognized, due to the increased number of immunocompromised patients and improvements in microbiological identification procedures [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

During the last decades, *Corynebacterium amycolatum* has been isolated from nosocomial infections, mainly in immunocompromised patients, including endocarditis, bacteremia,

septicemia, catheter-related infection, otitis, and mastitis [7, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. However, there are only a few reports in the literature of community-acquired and nosocomial urinary tract infections (UTIs) due to *C. amycolatum*. Recently, a study from Poland showed *C. amycolatum* as the third isolated pathogen (11.8%) in nosocomial UTIs, mostly from transplanted female patients [16].

Most of the reported cases of nosocomial infections due to *Corynebacterium* spp. were related to clinical isolates expressing MDR phenotypes [7, 11, 13]. MDR *C. amycolatum* strains have been associated with nosocomial infections with high mortality and morbidity rates [11]. Geographical variations in the frequency of *C. amycolatum* infections and MDR profiles have been reported [5, 7, 12, 15, 17, 18]. *C. amycolatum* strains have demonstrated varied resistance phenotypes, presenting resistance to the following antimicrobial agent groups: beta-lactams, aminoglycosides, macrolides, quinolones, including clindamycin and rifampin [11, 18, 19]. Consequently, further studies remain necessary to investigate *C. amycolatum* clinical and pathogenicity potential features. This study aimed to report clinical, epidemiological, and microbiological aspects of UTI caused by *C. amycolatum* in outpatients attended at a Brazilian ambulatorial unit.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design and origin of bacterial isolates**

Urine samples of 247 outpatients with clinical signs and symptoms of lower UTI, attended at a Brazilian ambulatorial unit were sent for microbiological analysis by using regular diagnostic cultures and also inoculated onto selective chocolate-tellurite agar (CTA) media at the hospital laboratory [20, 21].

Irregular Gram-positive rods (IGPRs) strains isolated from urine samples of outpatients were sent for microbiological analysis at the Experimental Microbiology Laboratory of the Nova Friburgo Institute Health (Fluminense Federal University), for one year period and used in the present study.

IGPR strains were considered potential pathogens when growth exceeded  $10^4$  colony-forming units per milliliter (CFU ml<sup>-1</sup>) as the only isolate or  $> 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup> as the predominant isolate [2].

Data related to outpatients (age and sex) and other Gram-positive and Gram-negative uropathogens identified during routine procedures were provided by the hospital laboratory and included in this work.

### **Culture conditions and phenotypic and molecular identification procedures**

Urine specimens were inoculated onto selective Tellurite-chocolate-agar media-Columbia Agar Base Difco®, with 5% defibrinated sheep blood and 1% potassium tellurite (CTA) plates and sent to the Experimental Microbiology Laboratory of Nova Friburgo Institute Health for microbiological analysis. TCA plates were incubated aerobically at 37°C for 24/48 hours up to 10 days.

Bacterial colonies which were capable of reducing potassium tellurite to tellurium and, thereby producing gray-black colored colonies, were picked up and then examined by Gram staining and tested for catalase activity [21, 22].

Clinical IGPR or coccobacilli isolates were identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), as previously described [11, 23], using the Biotyper system's automation control and the current Bruker Biotyper 3.1 software and library.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

Antimicrobial susceptibility profiles were determined by the disk diffusion method on a Mueller-Hinton agar (MHA) plate (Plast Labor®, Brazil) supplemented with 5% sheep blood using a bacterial inoculum in saline (0.9% NaCl) equivalent to a 0.5 McFarland standard. Results were interpreted based on criteria used for *Staphylococcus* spp. according to CLSI guidelines, except for Cefazolin, Ampicillin, Amoxicillin-clavulanic acid, Ampicillin-sulbactam and Imipenem, which were based on the criteria for *Enterobacteriaceae*, and Vancomycin, based on the criteria for *Enterococcus* spp. Intermediate results were considered resistant [1, 10, 13, 24].

Fifteen antibiotic disks (Sensifar, Cefar Diagnóstica Ltd, Brazil) were used: penicillin (10 U), ampicillin (10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin-sulbactam (10/10 µg), imipenem (10 µg), cefazolin (30 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), tetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), ciprofloxacin (5 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), vancomycin (30 µg) and rifampin (30 µg). MDR was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories [9, 25, 26].

### **Molecular detection of resistance genes**

#### ***Amplification and sequencing of bla and ampC resistance genes***

*C. amycolatum* isolates resistant to penicillin and cefazolin (n=7) were evaluated for the presence of the *bla* and *ampC* genes, encoding for a class A beta-lactamase involved in resistance to penicillins and cephalosporins, and a class C beta-lactamase, respectively, based on previously described methods for investigating other *Corynebacterium* species [27].

Briefly, bacterial isolates were cultured on tryptic soy agar overnight at 37°C. A single colony was inoculated into 100 µL sterile water and boiled at 100°C for 10 min. Cell debris was pelleted by centrifugation at 16,500g per 2 minutes, and the supernatant was collected and stored at -20°C. PCR reactions were performed using the AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System (Invitrogen, USA) for a final volume of 25 µl containing per sample: 2.5µL of AccuPrime™ 10x PCR Buffer II, 0.5µL of each primer (10µmol/µL), 0.5µL of Accuprime™ Taq DNA Polymerase, 19µL of DNase free water, and 2µL of template DNA. PCR amplification was performed under the following conditions: an initial cycle of 94°C at 3 min, and then 35 cycles of 94°C at 1 min, 58°C at 45 sec, and 68°C at 45 sec, followed by a cycle of 68°C at 5 min with primer sets *bla* e *ampC*. Primers used to amplify the above-mentioned genes are listed in **Table 1** [27]. PCR products were purified with the ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems™, USA).

Purified DNA was sequenced by Sanger methodology with the primers outlined in **Table 1**, with the automatic sequencer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, USA). Sequencing reactions were performed using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, USA) following standard protocols. The *bla* and *ampC* genes sequences were compared to *Corynebacterium* species available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm [28].

#### ***Accession numbers***

The accession numbers of *bla* gene sequences of isolates BR-SW-04, BR-SW-14, BR-SW-23, BR-SW-25, BR-SW-27, BR-SW-28 and BR-SW-33 were deposited at GenBank under the accession ON630901, ON630902, ON630903, ON630904, ON630905, ON630906 and ON630907, respectively.

#### ***Ethical approval***

This study takes part of the main project of LDCIC laboratory that includes diagnosis activities without direct human patient contact. (I) The project (CAAE 25847614.8.0000.5259) was

approved by the Research Ethics Committee of Hospital Universitário Pedro Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Written informed consent for participation was not required for this study following the national legislation and the institutional requirements, and the investigated isolate was taken as a part of standard care (diagnostic purposes); (II) Moreover this collaborative study, which did not directly involve any human or animal participants, was also approved by the Research Ethics Committee of Fluminense Federal University (CAAE: 67843417.1.0000.5626), since did not contain any human or animal participants.

## RESULTS

### *C. amycolatum* strains recovered from infected patients

During one year of study, 63 IGPR strains were isolated from urine samples of 247 (23.9%) outpatients with clinical signs and symptoms of UTI attended at a Brazilian ambulatorial unit and submitted to laboratory diagnostic procedures.

From a total of positive bacterial cultures for IGPRs selected for further identification due to suspect UTI, analysis by MALDI-TOF identified 59(93.65%) strains as *Corynebacterium* spp., including 38 (60.31%) as *C. amycolatum* (Score  $\geq 2.0$ ).

In **Table 2** data showed *C. amycolatum* strains isolated from patients in pure culture (n=14; 36.84%), or co-isolated with other pathogens: *Escherichia coli* (n=22; 57.90%), *Klebsiella* sp. (n= 01; 2.63%) or *Enterococcus* sp. (n= 01; 2.63%). Concomitant growth of *C. amycolatum* and other IGPR species ( $\geq 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>), as *Corynebacterium* spp. (n= 04; 10.53%), *Brevibacterium* spp. (n= 02; 5.26%) or *Brevibacillus* spp. (n= 1; 2.63%), was also observed.

*C. amycolatum* strains were predominantly isolated from adults at working age (63.16%), followed by the elderly (28.95%) - 97.37% from females and 2.63% from males. Moreover, *C. amycolatum* strains were also isolated from children (n=3; 7.89%); in pure culture (n=1) or numerically predominant colonies in association with *Escherichia coli* (n=2).

### *Antimicrobial multidrug-resistance properties*

#### *Heterogeneity of antimicrobial susceptibility testing results for C. amycolatum strains obtained from outpatients with urinary tract infection*

Antimicrobial susceptibility testing results of the 38<sup>0</sup>*C. amycolatum* strains are presented in **Tables 2, 3** and **Table S1**. Most of them (>50%) were found resistant to penicillin, erythromycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Moreover, all *C. amycolatum* strains were resistant to nitrofurantoin and expressed resistance activity to at least one of the others antibiotics tested, except vancomycin and rifampin.

#### *Multidrug-resistance profiles*

Among the 38<sup>0</sup>*C. amycolatum* strains, 33 (86.84%) expressed MDR profiles. A total of 19 MDR *C. amycolatum* strains were isolated from adults, whereas 7 were obtained from elderly females and 2 from children with 3-years old and 12-years old age. MDR *C. amycolatum* strains were grown in pure culture (n=8) or in numerically predominant colonies in association with *E. coli* (n=20) and other Gram-negative and Gram-positive bacteria, such as *Enterococcus* sp. (n=1), *Brevibacterium* spp. (n=2), *Brevibacillus* sp. (n=1) and *Corynebacterium* spp. (n=5).

Heterogeneity of antimicrobial resistance profiles expressed by *C. amycolatum* strains obtained from outpatients with urinary tract infections was demonstrated in **Tables 2 and 3**.

### *Antimicrobial resistance to beta-lactams*

Seven (18.42%) MDR *C. amycolatum* tested strains were positive for the *bla* gene encoding class A beta-lactamase involved in resistance to penicillins and cephalosporins (**Table 4**).

However, all tested strains gave negative results for the *ampC* gene encoding a class C beta-lactamase.

## DISCUSSION

Urinary tract infections (UTI) are one of the most common bacterial infections in both outpatient and inpatient settings and accounts for an important proportion of healthcare costs as a result of outpatient visits, diagnostic tests, and prescriptions [29, 30].

In the present study, *Corynebacterium* spp. were isolated from 23.9% of cases of UTI in outpatients attended at a Brazilian ambulatorial unit. Interestingly, most of the clinical isolates were identified as *C. amycolatum*, predominantly isolated from adults of working age, especially women, that have been reported more vulnerable to UTI, when compared to men, due to anatomical and physiological factors [31]. Since acute uncomplicated UTIs reach approximately 10% of women at least every year, and 60% of women at least once in their lifetime, with recurrence in 5% of cases, antimicrobial therapy is frequently prescribed [32, 33]. Gram-negative bacteria found in the gut are the most common reported uropathogens, mainly *E. coli* and *Klebsiella* spp. However, Gram-positive etiologic agents of UTI in hospitalized and outpatients are also verified, such as *Enterococcus* spp.; *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*; *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus*, and *S. hominis* [34, 35, 36]. Moreover, MDR bacterial genus includes a wide range of potential urinary tract pathogens. Different species expressing MDR profiles have been increasingly reported in community-acquired infections, though prevalence differs by region [6, 36, 37, 38]. Remarkably, present findings demonstrated *C. amycolatum* strains isolated from community-acquired UTI patients, including immunocompetent children, expressing an unexpectedly high number (86.84%) of MDR profiles.

During the last decades, investigations have been demonstrating an alarmingly increasing frequency of antimicrobial resistance among pathogenic *Corynebacterium* species [1, 2, 4, 7, 9, 18]. A higher number of reported cases of infections are mainly due to deeper attention given to both the pathogenic potential and taxonomy of this bacterial genus, in addition to the increased number of immuno-compromised patients [3]. However, the importance of *Corynebacterium* isolates in clinical settings is still underestimated, either because the number of organisms present is below the culture threshold of  $10^3$  CFU ml<sup>-1</sup>, or because these bacteria grow more slowly on usual culture media and require special culture conditions, such as enriched and selective media or prolonged incubation time, or might be incorrectly classified [18, 39]. Currently, species like *C. amycolatum* have been increasingly recovered from clinical specimens, like catheter tips, urine, and pus samples, and recognized as potential pathogens, especially in debilitated patients and as hospital-acquired pathogens [7, 13, 40].

Although the acquisition of resistance is a natural process, the misuse of antimicrobials in human and veterinary practice, inadequate surveillance, and the poorly controlled regulation of antibiotics in clinical medicine and the livestock industry has exacerbated the appearance and spread of MDR microorganisms [41, 42]. Antimicrobial resistance occurs as a result of target alteration, decreased drug accumulation, and drug modification, and it may be an innate feature of a microorganism or may result from mutation or acquisition of exogenous resistance genes [42, 43]. Hydrolysis of beta-lactam antibiotics by beta-lactamases, the most common mechanism of resistance for this class of antimicrobial agents, was also previously observed among *C. striatum* strains. Data also revealed high resistance rates to beta-lactams and a high prevalence of the *bla* and the *ampC* genes among *C. striatum* clinical isolates from a hospital unit located at Tunisia [27].

In conclusion, *C. amycolatum* strains expressing heterogenic MDR profiles, presenting *bla* gene encoding class A beta-lactamase involved in resistance to penicillins and cephalosporins, were found as the etiologic agent of community-acquired UTI in an urban area located in Brazil.

Therefore, current study showed an alarming rate of *C. amycolatum* strains characterized as uropathogens with variable antimicrobial resistance patterns in South America, emphasizing the worldwide dissemination of MDR *Corynebacterium* pathogenic species. These findings also reinforce the importance of *Corynebacterium* spp. strains not be promptly discarded as contaminants even when found associated with one or more potentially pathogenic strains in a clinical sample from hospitalized and outpatients, regardless of age, gender and comorbidities. Mechanisms of multifactorial nature may directly or indirectly contribute to the virulence potential of *C. amycolatum* strains and strategies to overcome environmental and chemical challenges, including antimicrobial agents, should be further investigated. Additional studies must be conducted to define the clonal nature and dissemination of MDR *C. amycolatum* pathogenic strains in community and hospital environment units in Brazil and other countries.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant from CNPq, CAPES, FAPERJ and SR-2/UERJ. We would like to thank you *in memoriam* Dr. Raphael Hirata Júnior for all the support and teaching through all this study. You will be missed.

### CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no conflict of interest

### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

**Conceived and designed the experiments:** Gomes, SWG; Póvoa, HCC; Mattos-Guaraldi, AL; **Performed the experiments:** Gomes, SWG; Longo, LGA; Sant'Anna, LO; Vieira, VV; **Data analysis and draft of the manuscript were performed by** Gomes, SWG, Sant'Anna, LO, Heggendorrn, LH, Schimidt, DB, Longo, LGA, Souza, C, Vieira, VV; Mattos-Guaraldi, AL; Póvoa, HCC and Santos, LS. All authors approved the final version of the manuscript for submission.

### REFERENCES

1. Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2003; 34:39-44.
2. Baio PVP, Mota HF, Freitas A, Gomes DLR, Ramos JN, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108(1):23-29.
3. Gherardi G, Di Bonaventura G, Pompilio A, Savini V. *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract infection: Case report and review of the literature. *IDCases.* 2015; 2(2):56-58.
4. Souza CD, Faria YV, Sant'Anna LO, Viana VG, Seabra SH et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(2):242-248.
5. Rudresh SM, Ravi GS, Alex AM, Mamatha KR, Sunitha, L et al. Non diphtheritic Corynebacteria: an emerging nosocomial pathogen in skin and soft tissue infection. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(12):DC19-DC21.
6. Kline KA, Lewis AL. Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. *Microbiol Spectr.* 2016; 459-502.
7. Carvalho RV, Lima FFDS, Santos CSD, Souza MCD, Silva RSD et al. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Braz J Infect Dis.* 2018; 22(4):347-351.
8. Fernández-Alonso M, Reina G, Rubio M, Leiva, J. Infecciones por *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. y *Listeria* spp. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* 2018; 12(49):2901-2909.
9. Ramos JN, Souza C, Faria YV, Silva EC, Veras JFC et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect Dis.* 2019; 19(1):1-11.
10. Martins CDS, Faria LD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(6): 905-913.
11. Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. In *Manual of Clinical Microbiology.* 11th ed. Washington, DC: ASM Press:2015.

12. Sengupta M, Naina P, Balaji V, Anandan S. *Corynebacterium amycolatum*: an unexpected pathogen in the ear. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(12):DD01-DD03.
13. Borde K, Rao V, Shah M, Pavani N, Anand M. Not always a commensal: A case of mastitis by *Corynebacterium amycolatum*. *IDCases*. 2020; 20:e00728.
14. Rasmussen M, Mohlin AW, Nilson B. From contamination to infective endocarditis—a population-based retrospective study of *Corynebacterium* isolated from blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020; 39(1):113-119.
15. Yamamuro R, Hosokawa N, Otsuka Y, Osawa R. Clinical Characteristics of *Corynebacterium* Bacteremia Caused by Different Species, Japan, 2014–2020. *Emerg Infect Dis*. 2021; 27(12): 2981.
16. Robert K, Anna SG, Grażyna M. *Corynebacterium* Species Causing Urinary Tract Infections. *Microbiol. Res. J. Int*. 2018; 24(5):1-9.
17. Adderson EE, Boudreaux JW, Hayden RT. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27(2):136-141.
18. Dragomirescu CC, Lixandru BE, Coldea IL, Corneli ON, Pana M, et al. Antimicrobial susceptibility testing for *Corynebacterium* species isolated from clinical samples in Romania. *Antibiotics*. 2020; 9(1):31.
19. Lagrou K, Verhaegen J, Janssens M, Wauters G, Verbist L. Prospective Study of Catalase-positive Coryneform Organisms in Clinical Specimens: Identification, Clinical Relevance, and Antibiotic Susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30(1):7-15.
20. Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, et al. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*, 6 th ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008, 1488 p.
21. Santos LS, Antunes CA, Oliveira DM, Sant’Anna LO, Pereira JAA, et al. Tellurite resistance: a putative pitfall in *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015; 108(5):1275-1279.
22. Taylor DE. Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol*. 1999; 7(3):111-115.
23. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(9):3093-3095.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. CLSI M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA2018.
25. Souza CD, Mota HF, Faria YV, Cabral FDO, Oliveira DRD, et al. Resistance to Antiseptics and Disinfectants of Planktonic and Biofilm-Associated Forms of *Corynebacterium striatum*. *Microb Drug Resist*. 2020; 26(12):1546-1558.
26. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RT, Carmeli Y, Falagas MT, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(3):268-281.
27. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Sci Rep*. 2017; 7(1):1-8.
28. Altschul SF, Gish W, Miller W et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990; 215(3):403-10.
29. Butler CC, Hawking MK, Quigley A, McNulty CA. Incidence, severity, help seeking, and management of uncomplicated urinary tract infection: a population-based survey. *Br J Gen Pract*. 2015; 65(639):e702-e707.
30. Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. Urinary tract infection. *Ann Intern Med*. 2017; 167(7): ITC49-ITC64.
31. Vasudevan R. Urinary tract infection: an overview of the infection and the associated risk factors. *J Microbiol Exp*. 2014;1(2):42-54.
32. Nicolle LE. Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. *Urol Clin North Am*. 2008; 35(1):1-12.
33. Lee SH, Suh J, Kim HS, Lee YJ, Lee SR et al. Prevalence and management status of urologic diseases in geriatric hospitals in South Korea: A field research. *Investig Clin Urol*. 2017; 58(1):70-76.
34. Gomes SWC, Heggendorff LH, Silva NA, Varges RG, Póvoa HCC. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Uropathogens Isolated from Ambulatorial and Nosocomial Infections at Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil. *Epidemiol Controle Infecç*. 2017; 7(1):52-56.
35. Gajdács M, Ábrók M, Lázár A, Burián K. Increasing relevance of Gram-positive cocci in urinary tract infections: A 10-year analysis of their prevalence and resistance trends. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 1-11.
36. Mahony M, McMullan B, Brown J, Kennedy SE. Multidrug-resistant organisms in urinary tract infections in children. *Pediatr Nephrol*. 2020; 35(9): 1563-1573.
37. Dayan N, Dabbah H, Weissman I, Aga I, Even L et al. Urinary tract infections caused by community-acquired extended-spectrum beta-lactamase-producing and nonproducing bacteria: a comparative study. *J Pediatr*. 2013; 163(5):1417-1421.
38. Jo KJ, Yoo S, Song JY, Kim SH, Park SE. Non-carbapenem antimicrobial therapy in young infant with urinary tract infections caused by community-acquired extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Pediatr Neonatol*. 2021; 62(3):271-277.



39. Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(3):871-876.
40. Reddy BS, Chaudhury A, Kalawat U, Jayaprada R, Reddy GSK et al. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian J Med Microbiol.* 2012; 30(1):52-57.
41. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4(1):36-45.
42. Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A. Incidence and diversity of antimicrobial multidrug resistance profiles of uropathogenic bacteria. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:11 p.
43. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 20-51.

## Tables

**Table No. 1:** Primers used in this study for detection and sequencing of resistance genes of *Corynebacterium amycolatum* strains

Gene	Related resistance	DNA sequence (5'-3')	Annealing temp	Size (bp)	Reference
<i>bla</i>	beta-lactams	CAGTCTAGCCACTTCGCCAAT TGACTGCACGGATGGAGATGG	58°C	808	Alibi et al. 2017 adapted
<i>ampC</i>	beta-lactams	CAATCGGATTCCTGGTCGCT TGGTTCGCGTGATGTTTTTCG	58°C	965	

**Table No. 2:** Epidemiological and heterogenic antimicrobial resistance profiles of 38 *Corynebacterium amycolatum* clinical strains isolated from outpatients with urinary tract infections of different age groups and sex.

Urine isolates (n=38)	clinical Outpatients Sex/Age	Culture	Antimicrobial resistance	
			Agents/classes	Profiles
BR-SW-14	F/90	<i>Brevibacterium</i> sp.; <i>Escherichia coli</i>	PEN, AMP, AMC, SAM/ CFZ/ IPM/ ERY/ CLI/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-33	F/49	<i>E. coli</i>	PEN, AMP, AMC, SAM/ CFZ/ IPM/ ERY/ CLI/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-23	F/53	Pure	PEN, AMP, AMC, SAM/ CFZ/ IPM/ ERY/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-27	M/56	Pure	PEN, AMP, SAM/ CFZ/ IPM/ GEN/ ERY/ CLI/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-28	F/48	<i>E. coli</i>	PEN, AMP, AMC/ CFZ/ IPM/ ERY/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-04	F/31	<i>E. coli</i>	PEN, AMP AMC, SAM/ CFZ/ IPM/ ERY/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-25	F/56	Pure	PEN, AMP, SAM/ CFZ/ IPM/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-32	F/48	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>E coli</i>	PEN/ GEN/ ERY/ CLI/ TET/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-29	F/3	<i>E. coli</i>	PEN, AMP/ ERY/ CLI/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-01	F/12	<i>E. coli</i>	PEN, AMP/ ERY/ CLI/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-06	F/85	<i>Brevibacterium</i> sp.	PEN, AMC, SAM/ ERY/ NIT	MDR
BR-SW-87	F/92	<i>E. coli</i>	PEN/ ERY/ CLI/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-49	F/76	<i>E. coli</i>	TET/ ERY/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-78	F/38	Pure	CLI/ ERY/ CIP/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-03	F/70	Pure	PEN/ ERY/ CLI/ NIT	MDR
BR-SW-19	F/37	<i>Brevibacillus</i> sp.	PEN/ ERY/ CLI/ NIT	MDR
BR-SW-10	F/27	Pure	PEN/ ERY/ NIT/ CIP	MDR
BR-SW-24	F/18	<i>E. coli</i>	PEN/ ERY/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-15	F/64	<i>E. coli</i>	PEN/ ERY/ CIP/ NIT	MDR
BR-SW-58	F/29	<i>E. coli</i>	PEN/ ERY/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-38	F/35	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>E coli</i>	ERY/ CLI/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-26	F/31	<i>E. coli</i>	ERY/ CLI/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-37	F/21	<i>Corynebacterium</i> sp.	ERY/ CLI/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-61	F/92	<i>E. coli</i>	TET/ ERY/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-51	F/42	<i>E. coli</i>	GEN/ ERY/ NIT/ SXT	MDR
BR-SW-17	F/33	<i>E. coli</i>	PEN/ ERY/ NIT	MDR
BR-SW-60	F/58	<i>E. coli</i>	PEN/ ERY/ NIT	MDR
BR-SW-74	F/54	Pure	PEN/ CIP/ NIT	MDR
BR-SW-12	F/54	<i>Klebsiella</i> sp.	PEN/ CIP/ NIT	MDR

BR-SW-85	F/28	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>Enterococcus</i> sp.	ERY/ NIT/ SXT	<b>MDR</b>
BR-SW-84	F/75	<i>Corynebacterium</i> sp.	ERY/ NIT/ SXT	<b>MDR</b>
BR-SW-16	F/30	Pure	ERY/ CLI/ NIT	<b>MDR</b>
BR-SW-21	F/75	<i>E. coli</i>	ERY/ CLI/ NIT	<b>MDR</b>
BR-SW-52	F/72	<i>E. coli</i>	CIP/ NIT/ SXT	<b>MDR</b>
BR-SW-08	F/55	Pure	NIT/ SXT	<b>MDS</b>
BR-SW-43	F/69	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>E coli</i>	NIT/ SXT	<b>MDS</b>
BR-SW-20	F/44	Pure	NIT	<b>MDS</b>
BR-SW-42	F/3	Pure	NIT	<b>MDS</b>

Legend: PEN penicillin, AMP ampicillin, AMC amoxicillin-clavulanate, SAM ampicillin-sulbactam, CFZ cefazolin, IMP Imipenem ERY erythromycin, CLI clindamycin, CIP ciprofloxacin, SXT trimethoprim-sulfamethoxazole, MDR Multidrug-resistant, NIT nitrofurantoin, GEN gentamicin, TET tetracycline, MDS Multidrug susceptible

**Table No. 3:** Antimicrobial susceptibility levels of *Corynebacterium amycolatum* strains obtained from outpatients with urinary tract infection attended at a Brazilian ambulatorial unit

<b>Antimicrobial Agents</b>	<b>Resistance n (%)</b>	<b>Susceptibility n (%)</b>
Ampicillin	9 (23.68)	29 (76.32)
Ampicillin-sulbactam	7 (18.42)	31 (81.58)
Amoxicillin-clavulanic acid	6 (15.79)	32 (84.21)
Cefazolin	7 (18.42)	31 (81.58)
Ciprofloxacin	14 (36.84)	24 (63.16)
Clindamycin	15 (39.47)	23 (60.53)
Erythromycin	30 (78.95)	8 (21.05)
Gentamicin	3 (7.89)	35 (92.11)
Imipenem	7 (18.42)	31 (81.58)
Nitrofurantoin	38 (100.0)	0 (0.00)
Penicillin	22 (57.89)	16 (42.11)
Rifampin	0 (0)	38 (100)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	25 (65.79)	13 (34.21)
Tetracycline	3 (7.89)	35 (92.11)
Vancomycin	0 (0)	38 (100)

**Table No. 4:** Presence of genes encoding beta-lactamase involved in mechanisms of resistance to penicillins and cephalosporins among six multidrug-resistant *Corynebacterium amycolatum* strains acting as the etiologic agent of urinary tract infections in outpatients

Clinical strains	beta-lactams	Antimicrobial resistance						beta-lactamase genes*
		Agents						
BR-SW-14	PEN/ AMP/ AMC/ SAM/ CFZ/ IPM	ERY	CLI	-	CIP	-	SXT	<i>bla</i>
BR-SW-33	PEN/ AMP/ AMC/ SAM/ CFZ/ IPM	ERY	CLI	-	CIP	NIT	SXT	<i>bla</i>
BR-SW-23	PEN/ AMP/ AMC/ SAM/ CFZ/ IPM	ERY	-	-	CIP	NIT	SXT	<i>bla</i>
BR-SW-27	PEN/ AMP/ SAM/CFZ/ IPM	ERY	CLI	GEN	-	NIT	SXT	<i>bla</i>
BR-SW-28	PEN/ AMP/ AMC/ CFZ/ IPM	ERY	-	-	CIP	NIT	SXT	<i>bla</i>
BR-SW-04	PEN/ AMP/ SAM/CFZ/ IPM	ERY	-	-	-	NIT	SXT	<i>bla</i>
BR-SW-25	PEN/ AMP/ SAM/CFZ/ IPM	-	-	-	CIP	NIT	SXT	<i>bla</i>

Legend: MDR multidrug-resistant, ERY erythromycin, CLI clindamycin, GEN gentamicin, NIT nitrofurantoin, SXT trimethoprim-sulfamethoxazole, PEN penicillin, AMP ampicillin, SAM ampicillin-sulbactam, CFZ cefazolin, IPM imipenem, CIP ciprofloxacin, AMC amoxicillin-clavulanic acid. \*All tested strains gave negative results for the *ampC* gene encoding a class C beta-lactamase.

## Supplemental material

Table S1 - Antimicrobial agents zone diameter (mm) of *Corynebacterium amycolatum* clinical isolates evaluated in this work

<i>C. amycolatum</i> strains	ANTIMICROBIAL AGENTS ZONE DIAMETER (mm)														
	NIT	CIP	RIF	AMC	IPM	VAN	CFZ	AMP	PEN	GEN	TET	CLI	ERY	SXT	SAM
BR-SW-14	0	0	39	14	0	27	0	0	0	33	28	0	12	12	0
BR-SW-33	0	0	34	0	0	25	0	0	0	28	28	0	16	0	0
BR-SW-23	0	0	40	17	14	27	0	0	0	30	32	23	19	0	0
BR-SW-27	0	22	40	26	0	23	0	0	0	0	21	0	18	0	0
BR-SW-28	9	0	47	16	0	26	0	0	0	33	35	22	21	0	18
BR-SW-04	10	21	36	0	18	26	0	0	0	27	31	25	20	0	0
BR-SW-25	0	20	40	32	0	26	0	0	0	34	28	28	40	0	0
BR-SW-32	0	13	32	27	36	22	30	25	23	0	16	0	15	0	24
BR-SW-29	0	0	41	26	34	26	30	0	0	16	22	0	14	0	27
BR-SW-01	0	31	31	31	35	24	21	0	0	20	20	19	19	17	25
BR-SW-06	0	40	37	0	30	26	27	24	24	28	28	25	19	16	0
BR-SW-87	0	24	46	36	50	32	40	31	27	30	40	0	19	0	38
BR-SW-49	0	15	42	42	42	26	38	32	30	32	16	22	17	0	32
BR-SW-78	10	0	46	34	40	24	36	34	31	17	36	0	21	0	34
BR-SW-03	0	40	30	23	29	24	24	24	20	25	27	20	13	22	22
BR-SW-19	0	22	40	31	40	27	30	28	26	15	24	0	0	20	28
BR-SW-10	0	20	37	27	34	24	26	23	22	28	32	23	20	16	29
BR-SW-24	0	22	40	33	38	27	32	26	28	30	36	27	22	0	30
BR-SW-15	0	19	36	34	39	28	32	29	27	17	31	26	22	0	28
BR-SW-58	0	21	48	28	26	33	33	29	19	35	42	25	11	0	26
BR-SW-38	0	40	42	31	40	27	34	28	30	31	35	0	14	0	35
BR-SW-26	0	40	44	44	52	26	40	48	40	28	31	0	11	0	40
BR-SW-37	0	41	42	36	44	28	38	34	36	30	34	20	19	0	34
BR-SW-61	0	23	45	45	46	27	40	36	32	34	16	28	21	0	41

BR-SW-51	0	24	46	43	48	28	40	38	32	13	36	22	22	0	37
BR-SW-17	0	22	30	26	42	29	28	28	26	34	32	24	20	16	26
BR-SW-60	0	27	46	36	42	25	36	26	0	23	36	31	20	22	31
BR-SW-74	14	18	34	35	46	29	34	40	28	38	40	26	25	20	28
BR-SW-12	12	16	43	35	37	29	31	28	28	26	36	29	27	17	22
BR-SW-85	0	42	50	20	50	28	42	41	36	31	46	26	22	0	50
BR-SW-84	0	24	46	42	20	32	42	40	36	34	40	36	20	0	38
BR-SW-16	0	34	34	40	41	27	39	32	32	32	36	0	0	22	34
BR-SW-21	0	28	50	20	50	26	42	42	40	29	36	20	14	26	38
BR-SW-52	0	20	44	36	42	28	33	30	30	36	38	26	25	0	32
BR-SW-08	0	40	50	36	40	28	40	30	30	40	40	30	40	0	22
BR-SW-43	0	40	48	42	56	31	48	20	42	34	40	30	40	11	20
BR-SW-20	0	50	40	50	20	24	20	50	42	32	40	24	24	24	30
BR-SW-42	9	40	46	48	60	29	47	43	36	33	38	30	40	20	20

Legend: NIT nitrofurantoin, CIP ciprofloxacin, RIF Rifampin, AMC amoxicillin-clavulanic acid, IPM imipenem, VAN Vancomycin, CFZ cefazolin, AMP ampicillin, PEN penicillin, GEN gentamicin, TET tetracycline, CLI clindamycin, ERY erythromycin, SXT trimethoprim-sulfamethoxazole, SAM ampicillin-sulbactam.

### **3.2 Artigo 2: Isolamento de cepas MDR e potencialmente invasivas de *Brevibacterium ravenburgense* e *Corynebacterium amycolatum* de uma amostra de urina humana**

Embora os patógenos da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, representem a maioria dos isolados de infecção do trato urinário (ITU), bactérias Gram-positivas, como corineformes, também podem causar ITU. Idosos, gestantes e outros indivíduos imunocomprometidos parecem ser mais suscetíveis à infecções por esses microrganismos. Os uropatógenos multidroga-resistentes (MDR) têm sido uma preocupação adicional para esses pacientes. Assim, relatamos o primeiro isolamento de *Brevibacterium ravenburgense*, em associação com cepas de *Corynebacterium amycolatum* e *Escherichia coli*, a partir de uma amostra de urina de um idoso atendido em uma unidade ambulatorial no Brasil. A identificação bacteriana foi realizada por meio de testes fenotípicos convencionais e Espectrometria de Massa de Tempo de Voo de Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS), e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana foi determinado pelo método de difusão em disco. Adicionalmente, os padrões de aderência às células epiteliais humanas (células Hep-2) das cepas corineformes foram investigados. Todos os microrganismos avaliados neste estudo apresentaram fenótipos MDR. *B. ravenburgense* e *C. amycolatum* exibiram um padrão de aderência do tipo agregativo às células HEp-2 3h após a infecção, o que pode indicar um potencial invasivo. O isolamento desses microrganismos incomuns que apresentam resistência a diversos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de infecções adquiridas tanto na comunidade quanto em hospitais reforça a importância da identificação correta para uma melhor abordagem terapêutica, bem como a necessidade de vigilância constante da resistência antimicrobiana.

1 **Isolation of multidrug-resistant and potentially invasive strains of *Brevibacterium***  
2 ***ravenspurgense* and *Corynebacterium amycolatum* from a human urine sample**  
3

4 Sara Wilis Cussuol Gomes<sup>1,2</sup>, Lorraine Herdy Heggendorrn<sup>1,2</sup>, Luís Guilherme de A. Longo<sup>3</sup>,  
5 Lincoln de O. Sant'Anna<sup>1</sup>, Juliana Nunes Ramos<sup>1</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>4</sup>, Helvécio Cardoso  
6 Corrêa Póvoa<sup>2</sup>, Ana Luíza Mattos Guaraldi<sup>1</sup>, Louisy S. dos Santos<sup>1</sup>  
7

8 <sup>1</sup>Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Faculdade de Ciências  
9 Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

10 <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Experimental e Aplicada, Instituto de Saúde de Nova Friburgo,  
11 Universidade Federal Fluminense, Brazil.

12 <sup>3</sup>Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de  
13 Janeiro, Brazil

14 <sup>4</sup>Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED), Instituto Oswaldo Cruz,  
15 Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.  
16  
17

18 **Corresponding author:** Louisy S. dos Santos, Laboratório de Difteria e Corinebactérias de  
19 Importância Clínica. Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências  
20 Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87 – Fundos, 3º andar,  
21 Vila Isabel, RJ, Brazil, CEP 20551-030, +55 21 2868-8280. e-mail:  
22 [louisysanchesuerj@gmail.com](mailto:louisysanchesuerj@gmail.com)  
23  
24

25 **Abstract**  
26

27 Although *Enterobacteriaceae* pathogens, as *Escherichia coli*, represent the majority of urinary  
28 tract infection (UTI) isolates, Gram-positive bacteria, such as coryneforms, can also cause UTI.  
29 Elderly, pregnant women and other immunocompromised individuals seem to be more  
30 susceptible to infections by these microorganisms. Multidrug-resistant (MDR) uropathogens  
31 have been an additional concern for these patients. Thus, we report the first isolation of a  
32 *Brevibacterium ravenspurgense* strain, in association with *Corynebacterium amycolatum* and  
33 *Escherichia coli* strains, from a urine sample of an elderly outpatient in Brazil. The bacterial  
34 identification was performed by conventional phenotypic tests and/or Matrix-Assisted Laser  
35 Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), and the  
36 antimicrobial susceptibility profile were determined by the disk diffusion method. Additionally,  
37 the adherence patterns to human epithelial cells (HEp-2 cells) of the coryneform strains were  
38 investigated. All microorganisms evaluated in this study presented MDR profiles. *B.*  
39 *ravenspurgense* and *C. amycolatum* exhibited an aggregative-like adherence pattern to HEp-2  
40 cells 3h post-infection, which may indicate an invasive potential. The isolation of these  
41 uncommon microorganisms presenting resistance to diverse antimicrobials commonly used to  
42 treat both community- and hospital-acquired infections reinforces the importance of correct  
43 identification for a better therapeutic approach, as well as the need for constant surveillance of  
44 antimicrobial resistance.  
45

46 **Keywords:** adherence, multidrug resistance, urinary tract infection, mass spectrometry



## 47 Introduction

48

49 Elderly patients are often affected by chronic and debilitating diseases due to age-related  
50 alterations in immunology and, consequently, to decreased functional ability. Urinary tract  
51 infection (UTI) is one of the most common infections in these patients (TANG and CHAO,  
52 2016; KIM et al, 2019). Although UTIs are caused mainly by microorganisms of  
53 *Enterobacteriaceae* family, especially *Escherichia coli*, Gram-positive bacteria have been  
54 recognized as causative agent of UTI among elderly, pregnant, or patients who have other risk  
55 factors for UTI (GOMES et al., 2017; SEMAN et al, 2021; KLINE and LEWIS, 2016).

56 Non-diphtheriae *Corynebacterium* spp. (NDC) and others Irregularly Gram-positive  
57 Rods (IGPR), generally called coryneforms, are often found as constituent of human  
58 microbiota. However, some of them have been increasingly reported worldwide as causative  
59 agents of diverse human infections, such as UTI, mainly due to the increased number of  
60 immunocompromised patients, and improvement of identification and taxonomy methods  
61 (GHERARDI et al., 2015).

62 Although little is known about virulence factors and pathogenesis of infections caused  
63 by NDC, the frequent description of multidrug resistance (MDR) profiles along with the ability  
64 to adhere to biotic and abiotic surfaces and/ or to form biofilms, that protect bacteria against  
65 antimicrobial agents and the host immune responses, have demonstrated their concerning  
66 pathogenic potential (CARVALHO et al., 2018; RAMOS et al., 2019).

67 The genus *Brevibacterium* comprises aerobic coryneform organisms mostly often  
68 associated with milk and rarely described as opportunistic pathogens. Nevertheless, some of  
69 them have already been associated with invasive infections, such as bacteremia, endocarditis,  
70 and osteomyelitis, mainly in immunocompromised patients (ASAI et al., 2019; BENSON;  
71 TATEM, 2021; OCHI et al., 2021; BAL et al., 2015; EIDENSOHN et al., 2021).

72 Thus, recognizing the importance of these microorganisms, we describe here the  
73 isolation of three bacterial strains exhibiting an MDR profile, identified as *Brevibacterium*  
74 *ravenspurgense*, *Corynebacterium amycolatum* and *E. coli*, from the same urine sample of a  
75 Brazilian elderly outpatient.

76

## 77 Methods

78

### 79 *Origin, isolation, and bacterial identification*

80 A 90-year-old woman was attended at a Brazilian outpatient unit, presenting urinary  
81 symptoms, including painful, difficulty and high frequency of urinating, suggestive of UTI. A  
82 urine sample was collected, analyzed and inoculated on regular diagnostic culture media,  
83 cysteine-lactose electrolyte deficient agar (CLED)(Probac, Brazil), and incubated aerobically  
84 at 37°C for 24/48 hours at the outpatient unit laboratory. After the incubation period, the  
85 bacterial isolate was identified and its antimicrobial susceptibility profile was determined by  
86 the disk-diffusion method on Mueller Hinton Agar (MHA; Plast Labor®, Brazil) according to  
87 the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018). The results were provided by the  
88 outpatient unit laboratory and included in this work (KONEMAN et al., 2008).

89 The urine sample was also inoculated onto selective chocolate-tellurite agar - Columbia  
90 Agar Base medium (Difco®, EUA) with 5% defibrinated sheep blood and 1% potassium  
91 tellurite (Sigma Aldrich, USA), sent to Experimental Microbiology Laboratory (EML) of the  
92 Nova Friburgo Institute Health (Fluminense Federal University), and incubated aerobically at  
93 37°C for 24/48 hours (SANTOS et al., 2015). IGPR strains were characterized by conventional  
94 phenotypic tests and identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight  
95 Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), as previously described (FUNKE; BERNARD, 2015;  
96 THEEL et al., 2012).

97

## 98 Amplification and sequencing of 16S rRNA gene

99 Amplification of 16S rRNA gene was performed according to protocols previously  
100 described (KHAMIS, 2005). Sequencing reactions were performed using BigDye™ Terminator  
101 v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, USA) following standard protocols. The  
102 16S rRNA gene sequence was compared to type strains sequences available on the EzBioCloud  
103 (<https://www.ezbiocloud.net>) server using the 16S-basedID application (YOON et al., 2017).

104

## 105 Antimicrobial susceptibility testing of IGPR strains

106

107 The antimicrobial susceptibility profiles of IGPR strains were determined by the disk  
108 diffusion method on MHA plate supplemented with 5% sheep blood (Plast Labor®, Brazil)  
109 using a bacterial inoculum in saline (0.9% NaCl) equivalent to a 0.5 McFarland standard.  
110 Results were interpreted based on criteria used for *Staphylococcus aureus* according to CLSI  
111 guidelines, except for Cephazolin, Ampicillin, Amoxicillin-clavulanic acid, Ampicillin-  
112 sulbactam and Imipenem, which were based on the criteria for *Enterobacteriaceae*.  
113 Intermediate results were considered resistant (CAMELLO et al., 2003; MARTINS et al., 2009;  
114 BORDE et al., 2020; CLSI, 2018).

115

116 Fifteen antibiotic disks (Sensifar, Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo, SP, Brazil) were  
117 used: penicillin (10 U), ampicillin (10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin-  
118 sulbactam (10/10 µg), imipenem (10 µg), cephazolin (30 µg), erythromycin (15 µg),  
119 clindamycin (2 µg), tetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), nitrofurantoin (300 µg),  
120 ciprofloxacin (5 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), vancomycin (30 µg) and  
121 rifampicin (30 µg). MDR was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in  
122 three or more antimicrobial categories (RAMOS et al., 2019; SOUZA et al., 2020;  
123 MAGIORAKOS et al., 2012).

123

## 124 Bacterial adherence patterns on HEp-2 cells

125

126 Adherence assay was performed based on earlier described methods, by using infected  
127 cells with microorganisms previously grown in Trypticase Soy Broth and suspended in Eagle's  
128 minimum essential medium (MEM) (Sigma Chemical Co, MO, USA) [multiplicity of infection  
129 (MOI) of 10] (HIRATA JR et al., 2002). Adherence assays were performed within semi-  
130 confluent HEp-2 cells grown on circular coverslips in MEM (13 mm diameter; Sigma, USA)  
131 supplemented with 5% fetal calf serum (Gibco-BRL, NY, USA), 50 µg ml<sup>-1</sup> gentamicin, 2.5 µg  
132 ml<sup>-1</sup> amphotericin B and 0.5% L-glutamine at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Microorganisms  
133 were washed twice in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, 0.01 M; pH 7.2) and resuspended  
134 in MEM to a concentration of 10<sup>7</sup> colony-forming units per mL (CFU ml<sup>-1</sup>), and used in  
135 adherence assays (3h incubation). Giemsa-stained coverslips were examined by bright field  
136 microscopy. Microorganisms were evaluated for their ability to display localized (LA; small  
137 clusters of bacteria resembling microcolonies), diffuse (DA; bacteria randomly distributed over  
138 HEp-2 cells surfaces) or aggregative (AA; clumps of bacteria with a “stacked-brick”  
139 appearance) phenotypes (HIRATA JR et al., 2008; SOUZA et al., 2012).

140

141 **Results**

142

## 143 Laboratory test results

144

145 Laboratory analysis revealed a turbid urine and positivity to nitrate, in addition to  
146 leukocyturia and bacteriuria. After 24h of incubation at 37°C, the outpatient unit laboratory

147 reported a significant bacterial growth ( $>1 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) in pure culture on CLED, and optical  
148 microscopy of colonies revealed the presence of Gram-negative bacteria, identified as *E. coli*.  
149 The isolate presented a MDR profile, being resistant to ampicillin, cephalosporin, ciprofloxacin,  
150 cefaclor, cefuroxime, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin, piperidic acid and cefotaxime, and  
151 susceptible to trimethoprim with sulfamethoxazole, gentamicin, and nitrofurantoin.

152 After incubation for 48h at EML, two distinct colony types were observed on the surface  
153 of CTA plate: a shiny and sticky ( $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>) and a matte whitish- gray ( $10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>).  
154 Microscopy of both colonies revealed the presence of irregular Gram-positive rods. MALDI-  
155 TOF analysis identified the shiny and sticky colony as *Brevibacterium ravensturnense* (score:  
156 1.993), and the whitish-gray one as *C. amycolatum* (score: 2.268).

157

#### 158 Accession numbers

159 The accession numbers of 16S rRNA gene sequences of isolates *Brevibacterium*  
160 *ravensturnense* and *Corynebacterium amycolatum*, were deposited at GenBank under the  
161 accession OP324814, ON605946 respectively.

162

#### 163 Antimicrobial susceptibility profile of the IGPR strains

164

165 Both IGPR strains presented a MDR profile. *B. ravensturnense* was found susceptible  
166 to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, imipenem, cephalosporin,  
167 tetracycline, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole and vancomycin, and resistant to the  
168 others antimicrobial agents tested. Similarly, *C. amycolatum* was found susceptible only to  
169 tetracycline, gentamicin, rifampicin, and vancomycin.

170

#### 171 Bacterial adherence patterns on HEp-2 cells

172

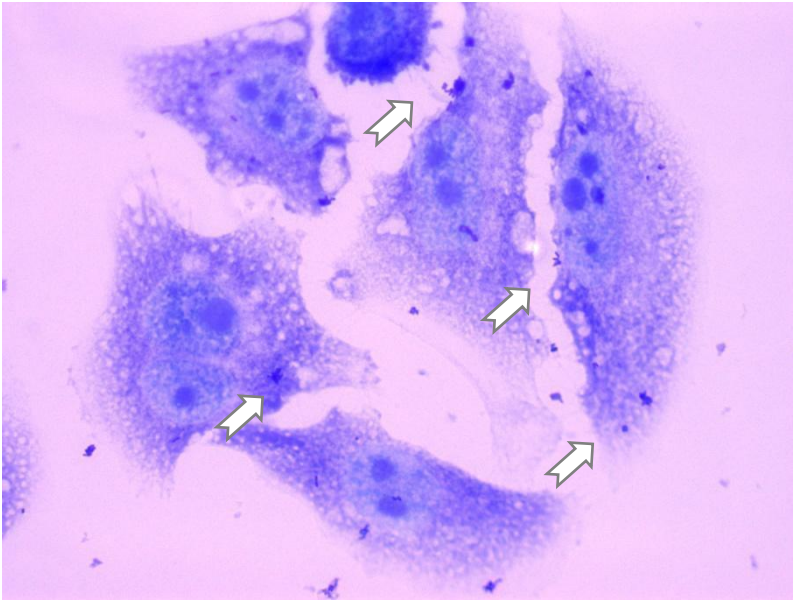
173 As illustrated in Fig 1, the microscopic examination of HEp-2 epithelial cells 3h post-  
174 infection with the IGPR strains revealed an AA-like adherence pattern, characterized by clumps  
175 of bacteria with a "stacked-brick" appearance, exhibited by both *B. ravensturnense* and *C.*  
176 *amycolatum* strains.

177

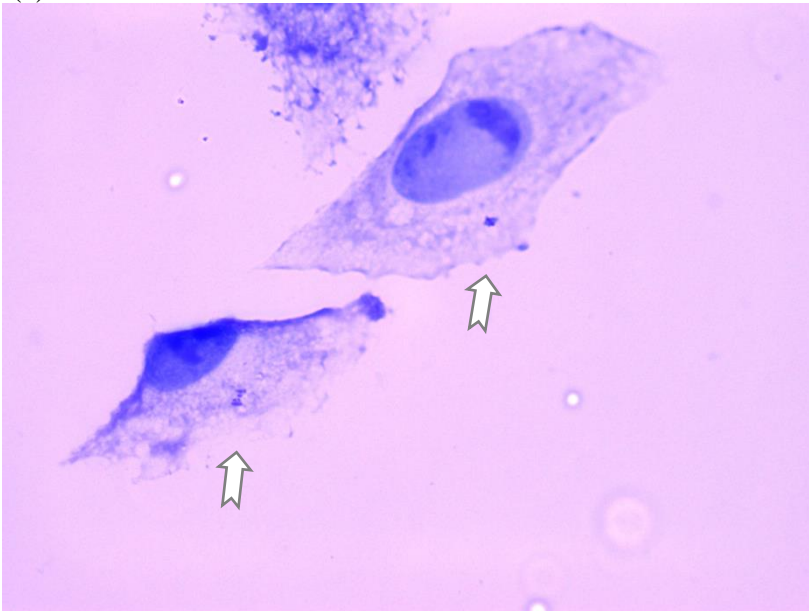
178

179

180



(a)



(b)

**Fig. 1.** Light micrographs illustrating the aggregative-like adherence pattern, characterized by clumps of bacteria with a "stacked-brick" appearance (arrows), exhibited by both clinical isolates of multidrug-resistant Irregular Gram-positive rods on the surface of human epithelial (HEp-2) cells 3h post-infection. (a) *Brevibacterium ravenspurgense*; (b) *Corynebacterium amycolatum*. Magnification: 1000X.

## Discussion

Elderly individuals are at particularly high risk for the development of UTI due to a range of disabilities such as incontinence, immobility, and cognitive impairment (KIM et al., 2019). Correct identification and management of UTI in these patients can be challenging due to atypical signs and symptoms of infection often presented by this group. The concern is accentuated when absence of immediate antibiotic treatment for UTI can lead to a bloodstream infection (SHALLCROSS et al., 2020).

199 Due to the high empiric use of antibiotics for the treatment of both community-acquired  
200 and healthcare-associated UTI, multidrug-resistance in microorganisms of *Enterobacteriaceae*  
201 family, specifically the main uropathogens *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*, has significantly  
202 increased worldwide, which could lead to a higher rate of treatment failure (MAZZARIOL et  
203 al., 2017; NAZIRI et al., 2020; SEMAN et al., NIGIZ et al.,2021). Currently, *E. coli* clinical  
204 isolate presented a MDR profile, being resistant to beta-lactams, most used antibiotics for  
205 bacterial infections. Resistance to beta-lactams, mainly mediated by beta-lactamases enzymes,  
206 have been increasingly reported worldwide (Santos et al., 2020). Resistance to quinolones, an  
207 antimicrobial class commonly used in the treatment of ITU, was also observed, even though no  
208 longer recommended in therapy around the world (Chao & Farrah, 2019).

209 Presently, a strain of *B. ravensturnensis* exhibiting a MDR profile was isolated in  
210 association with *E. coli*. Since it was described by MAGES et al. (2008), derived from a wound  
211 and a human blood culture, *B. ravensturnensis* is rarely reported as a clinical isolate in the  
212 literature, unlike other species of the genus, such as *Brevibacterium casei*, commonly reported  
213 as an agent of bloodstream infections. A draft genome sequence of the *B. casei* strain isolated  
214 from the clinical infection predicted 48 genes involved in resistance to antibiotics (including  
215 vancomycin, fluoroquinolones, and beta-lactams) and toxic compounds (heavy metals), 16  
216 genes involved in invasion and intracellular resistance (*Mycobacterium* virulence operons), and  
217 94 genes involved in stress response (osmotic, oxidative stress, cold and heat shock)  
218 (OLENDER et al., 2020).

219 As some *Brevibacterium* spp., several *Corynebacterium* spp. are found as members of  
220 human microbiota of skin and mucosal surfaces. However, the increased use of molecular  
221 methods in clinical microbiology laboratories has accurately identified *Corynebacterium* to the  
222 species level and demonstrated its potential for causing mild and invasive infections.  
223 Particularly, the introduction of MALDI-TOF MS has provided species determination  
224 of *Corynebacterium* with sufficient precision using improved databases and lower cutoff scores  
225 in the analysis of spectra (RASMUSSEN et al., 2019; MITCHELL et al., 2021).

226 The increase in the number of species of *Corynebacterium* isolated from urine samples  
227 over the years indicates the important role of these bacteria in the UTI epidemiology, especially  
228 in women (ROBERT et al., 2018). In the present study, a strain of *C. amycolatum*, susceptible  
229 only to tetracycline, rifampicin, gentamicin, and vancomycin, was also isolated from the  
230 patient's urine sample.

231 *C. amycolatum* have been reported as etiologic agent of otitis, mastitis, endocarditis,  
232 and infections in immunocompromised patients (SENGUPTA et al., 2015; BORDE et al., 2020;  
233 RASMUSSEN et al., 2019, CARVALHO et al., 2018). Antimicrobial resistance is often  
234 observed for *C. amycolatum* strains (DRAGOMIRESCU, et al., 2020). A recent study, reported  
235 daptomycin resistance, considered a drug of "last resort" for treatment of Gram-positive  
236 bacterial pathogens by a *C. amycolatum* strain (MITCHELL et al., 2021).

237 It is well known that the pathogen's adherence to the host cell represents a crucial  
238 process for the colonization and establishment of the infection. HEp-2 cell line has a long  
239 history as an *in vitro* cell model for investigating the pathogenic potential of several bacterial  
240 species, including *Escherichia coli* (SPANO et al., 2017) and *Corynebacterium* spp. (HIRATA  
241 Jr et al., 2008). For *Corynebacterium* spp., such as *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* and  
242 *C. diphtheriae*, the AA-pattern to HEp-2 have been correlated with the invasive potential and  
243 intracellular survival (HIRATA Jr et al. 2008). For other non-diphtheriae *Corynebacterium*  
244 spp., such as *C. striatum*, the ability to adhere to abiotic surfaces and form biofilms are better  
245 understood (RAMOS et al., 2019). However, for *C. amycolatum* and *B. ravensturnensis*,  
246 adherence mechanisms to these human cells have not been studied so far. Currently, both IGPR  
247 strains showed the ability to adhere to human epithelial HEp-2 cells 3h post-infection,  
248 presenting an AA-pattern, which may indicate an invasive potential of these strains. Other

249 studies remain necessary in order to confirm the invasive potential of *C. amycolatum* and *B.*  
250 *ravenspurgense*, as well as to better understand the mechanisms that allow them to colonize  
251 and/or infect human individuals.

252

### 253 **Conclusions**

254

255 In the present study, we describe the isolation of a strain of *E. coli* in association with  
256 two MDR strains of the IGPR group, *B. ravenspurgense* and *C. amycolatum*, from the urine of  
257 an elderly woman with clinical signs and symptoms of UTI. Although *C. amycolatum* has been  
258 recovered from human urine specimens and related to different types of human infections, to  
259 the best of your knowledge, this is the first report of isolation of *B. ravenspurgense* from human  
260 urine. Additionally, we provided the primary evidence of the ability of *B. ravenspurgense* and  
261 *C. amycolatum* to interact with human epithelial cells, suggesting a colonization mechanism  
262 that may aid in the establishment of an infection. Based on data obtained, we emphasize that  
263 correct identification and determination of the antimicrobial susceptibility profile of unusual  
264 microorganisms should be performed, even when associated with classical human pathogens,  
265 in order to establish the adequate therapy and improve the patient's prognosis.

266

267

### 268 **Conflicts of interest**

269 The authors declare that there are no conflicts of interest.

270

271

### 272 **Funding information**

273 This study was supported by the:

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

278

### 279 **Ethical approval**

280

281 This study takes part of the main project of LDCIC laboratory that includes diagnosis  
282 activities without direct human patient contact. (I) The project (CAAE  
283 25847614.8.0000.5259) was approved by the Research Ethics Committee of Hospital  
284 Universitário Pedro Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Written informed  
285 consent for participation was not required for this study in accordance with the national  
286 legislation and the institutional requirements, and the investigated isolate was taken as a part  
287 of standard care (diagnostic purposes); (II) Moreover this collaborative study, which did not  
288 directly involve any human or animal participants, was also approved by the Research Ethics  
289 Committee of Fluminense Federal University (CAAE: 67843417.1.0000.5626), since did not  
290 contain any human or animal participants.

291

292

293

294

## REFERENCES

- 295  
296  
297 1. Tang, H. J.; Chao, C. M. Nontyphoidal *Salmonella* urinary tract infection among elderly  
298 patients. **Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za**  
299 **zhi**, v. 49, n. 1, p. 157, 2016.  
300
- 301 2. Kim, S. J. et al. Management of *Candida* urinary tract infection in the  
302 elderly. **Urogenital Tract Infection**, v. 14, n. 2, p. 33-41, 2019.  
303
- 304 3. Gomes, S. W. C. et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Uropathogens  
305 Isolated from Ambulatorial and Nosocomial Infections at Nova Friburgo, Rio de Janeiro,  
306 Brazil. **Journal of Epidemiology and Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 52-56, 2017.  
307
- 308 4. Seman, A. et al. (2021). The Magnitude of Carbapenemase and ESBL Producing  
309 Enterobacteriaceae Isolates from Patients with Urinary Tract Infections at Tikur Anbessa  
310 Specialized Teaching Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. In: Donelli, G. (eds) *Advances in*  
311 *Microbiology, Infectious Diseases and Public Health. Advances in Experimental Medicine and*  
312 *Biology()*, vol 1369. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2021\\_687](https://doi.org/10.1007/5584_2021_687)  
313
- 314 5. Kline, K. A.; Lewis, A. L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract  
315 Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. **Microbiology spectrum**, v. 4, n.  
316 2, 2016.  
317
- 318 6. Gherardi, G. et al. *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract  
319 infection: Case report and review of the literature. **IDCases**, v. 2, n. 2, p. 56-58, 2015.  
320
- 321 7. Bal, Z. S., Sen, S., Karapinar, D. Y., Aydemir, S., & Vardar, F. (2015). The first reported  
322 catheter-related *Brevibacterium casei* bloodstream infection in a child with acute leukemia and  
323 review of the literature. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19, 213-215.  
324
- 325 8. Olender, A., Rutyna, P., Niemcewicz, M., Bogut, A., Ciesielka, M., & Teresiński, G.  
326 (2020). Draft whole-genome sequence of *Brevibacterium casei* strain isolated from a  
327 bloodstream infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 685.  
328
- 329 9. Carvalho, R. V. D., Lima, F. F. D. S., Santos, C. S. D., Souza, M. C. D., Silva, R. S. D.,  
330 & Mattos-Guaraldi, A. L. D. (2018). Central venous catheter-related infections caused by  
331 *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in  
332 paediatric oncology patients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22, 347-351.  
333
- 334 10. Ramos, J. N., Souza, C., Faria, Y. V., da Silva, E. C., Veras, J. F. C., Baio, P. V. P., ...  
335 & Vieira, V. V. (2019). Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of  
336 multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC infectious*  
337 *diseases*, 19(1), 1-11.  
338
- 339 11. Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, et al. *Diagnóstico*  
340 *microbiológico: texto e atlas colorido*, 6 th ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008, 1488  
341 p.  
342

- 343 12. Santos LS, Antunes CA, Oliveira DM, Sant'Anna LO, Pereira JAA, et al. Tellurite  
344 resistance: a putative pitfall in *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? *Antonie Van*  
345 *Leeuwenhoek*. 2015;108(5):1275-1279 [DOI](#). [PUBMED](#).  
346
- 347 13. Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. In *Manual of Clinical*  
348 *Microbiology* (eds J.H. Jorgensen, K.C. Carroll, G. Funke, M.A. Pfaller, M.L. Landry, S.S.  
349 Richter, D.W. Warnock, K.C. Carroll, G. Funke, K.A. Bernard, J.S. Dumler, M.B. Miller, C.A.  
350 Petti and P.A.R. Vandamme). 2015. [DOI](#).  
351
- 352 14. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC. Formic acid-based direct,  
353 on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser  
354 desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3093-  
355 3095 [DOI](#). [PUBMED](#).  
356
- 357 15. Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Nondiphtherial  
358 *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital,  
359 Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2003;34:39-44. [DOI](#).  
360
- 361 16. Martins CDS, Faria LD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E et al. Microbiological and  
362 host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst*  
363 *Oswaldo Cruz* 2009;104(6): 905-913. [DOI](#). [PUBMED](#).  
364
- 365 17. Borde K, Rao V, Shah M, Pavani N, Anand M. Not always a commensal: A case of  
366 mastitis by *Corynebacterium amycolatum*. *IDCases*. 2020;20:e00728 [DOI](#). [PUBMED](#).  
367
- 368 18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial  
369 susceptibility testing. CLSI M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne,  
370 PA2018.  
371
- 372 19. Souza CD, Mota HF, Faria YV, Cabral FDO, Oliveira DRD, et al. Resistance to  
373 Antiseptics and Disinfectants of Planktonic and Biofilm-Associated Forms of *Corynebacterium*  
374 *striatum*. *Microb Drug Resist* 2020;26(12):1546-1558 [DOI](#). [PUBMED](#).  
375
- 376 20. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RT, Carmeli Y, Falagas MT, et al. Multidrug-  
377 resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert  
378 proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*.  
379 2012;18(3):268-281 [DOI](#). [PUBMED](#).  
380
- 381 21. Hirata Jr, R., Napoleão, F., Monteiro-Leal, L. H., Andrade, A. F., Nagao, P. E., Formiga,  
382 L. C. D., ... & Mattos-Guaraldi, A. L. (2002). Intracellular viability of toxigenic  
383 *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS microbiology letters*, 215(1), 115-  
384 119.  
385
- 386 22. Hirata JR, R., Pereira, G. A., Filardy, A. A., Gomes, D. L. R., Damasco, P. V., Rosa, A.  
387 C. D. P., ... & Mattos-Guaraldi, A. L. Potential pathogenic role of aggregative-adhering  
388 *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. **Brazilian Journal of**  
389 **Medical and Biological Research** 2008, 41(11), 986-991.  
390



- 391 23. Souza, M.C. et al. Aggregative adherent strains of *Corynebacterium*  
392 *pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEP-2 epithelial cells. **Memórias do Instituto**  
393 **Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 486-493, 2012.
- 394
- 395 24. Shallcross L, Rockenschaub P, Blackburn R, Nazareth I, Freemantle N, Hayward A  
396 (2020) Antibiotic prescribing for lower UTI in elderly patients in primary care and risk of  
397 bloodstream infection: A cohort study using electronic health records in England. *PLoS Med*  
398 17(9): e1003336. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003336>
- 399
- 400 25. Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria  
401 causing urinary tract infections: a review. *J Chemother.* 2017;29(sup1):2–9.
- 402
- 403 26. Naziri Z, Derakhshandeh A, Soltani Borchaloe A, Poormaleknia M, Azimzadeh N.  
404 Treatment failure in urinary tract infections: a warning witness for virulent multi-drug resistant  
405 ESBL- producing *Escherichia coli*. *Infect Drug Resist.* 2020;13:1839–50.
- 406
- 407 27. Nigiz, Ş., Hazırolan, G., Köseoglu Eser, Ö., & Gür, D. (2021). First Detection of  
408 *Klebsiella pneumoniae* Isolate Co-Harboring Fosfomycin Resistance Gene fosA3 and bla ctm  
409 m Among Gram Negative Urine Isolates in a Turkish Hospital. *Microbial Drug Resistance.*
- 410
- 411 28. Asai N, Suematsu H, Yamada A, et al.: *Brevibacterium paucivorans* bacteremia: case  
412 report and review of the literature. *BMC Infect Dis.* 2019, 19:344. [10.1186/s12879-019-3962-](https://doi.org/10.1186/s12879-019-3962-y)  
413 [y](https://doi.org/10.1186/s12879-019-3962-y)
- 414
- 415 29. Benson, C. E., Jr, & Tatem, L. (2021). Successful Treatment of *Brevibacterium*  
416 *Bacteremia* Solely With Antimicrobial Therapy. *Cureus*, 13(6), e16004.  
417 <https://doi.org/10.7759/cureus.16004>
- 418
- 419 30. Fumihiro Ochi, Hisamichi Tauchi, Kyoko Moritani, Shinobu Murakami, Hitoshi  
420 Miyamoto, Mayo Ueda, Kozo Nagai, Minenori Eguchi-Ishimae, Mariko Eguchi, "A Catheter-  
421 Related Bloodstream Infection by *Brevibacterium casei* in a Child with Acute Myeloid  
422 Leukemia: Case Report and Literature Review", *Case Reports in Pediatrics*, vol. 2021, Article  
423 ID 6691569, 5 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6691569>
- 424
- 425 31. Eidensohn Y, Wei A, Sirkin M, Dever LL: *Brevibacteria tibial osteomyelitis.* *IDCases.*  
426 2021, 23:e01046. [10.1016/j.idcr.2021.e01046](https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01046)
- 427
- 428 32. MAGES, I. S. et al. Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-like bacteria  
429 encountered in human clinical specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 9, p.  
430 2980-2986, 2008.
- 431
- 432 33. Robert K, Anna SG, Grażyna M. *Corynebacterium* Species Causing Urinary Tract  
433 Infections. *Microbiol. Res. J. Int.* 2018;24(5):1-9 [DOI](https://doi.org/10.17140/2456-1704/2018240501).
- 434
- 435 34. Sengupta M, Naina P, Balaji V, Anandan S. *Corynebacterium amycolatum*: an  
436 unexpected pathogen in the ear. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(12):DD01-DD03 [DOI](https://doi.org/10.13733/journal.ajcd.2015.091201). [PUBMED](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/).
- 437
- 438 35. Rasmussen M, Mohlin AW, Nilson B. From contamination to infective endocarditis—  
439 a population-based retrospective study of *Corynebacterium* isolated from blood cultures. *Eur J*  
440 *Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;39(1):113-119 [DOI](https://doi.org/10.1007/s00431-018-0280-0). [PUBMED](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30811111/).

- 441  
442 36. Dragomirescu CC, Lixandru BE, Coldea IL, Corneli ON, Pana M, et al. Antimicrobial  
443 susceptibility testing for *Corynebacterium* species isolated from clinical samples in Romania.  
444 *Antibiotics*. 2020;9(1):31 DOI. [PUBMED](#).  
445
- 446 37. Mitchell, K. F., McElvania, E., Wallace, M. A., Droske, L. E., Robertson, A. E.,  
447 Westblade, L. F., & Burnham, C. A. D. (2021). Evaluating the Rapid Emergence of Daptomycin  
448 Resistance in *Corynebacterium*: a Multicenter Study. *Journal of clinical microbiology*, 59(4),  
449 e02052-20.  
450
- 451 38. Spano, L. C., Cunha, K. F., Monfardini, M. V., Fonseca, R. D. C. B., Scaletsky, I. C. A.  
452 High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from  
453 children and adults in southeastern Brazil. **BMC infectious diseases** 2017, 17(1), 1-9.  
454
- 455 39. Santos, A. L., Dos Santos, A. P., Ito, C. R. M., Queiroz, P. H. P. D., de Almeida, J. A.,  
456 de Carvalho Júnior, M. A. B., ... & Carneiro, L. C. (2020). Profile of Enterobacteria resistant to  
457 beta-lactams. *Antibiotics*, 9(7), 410.  
458
- 459 40. Chao, Y. S., & Farrah, K. (2019). Fluoroquinolones for the Treatment of Urinary Tract  
460 Infection: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines.  
461
- 462 41. Khamis A, Raoult D, Scola B La. Comparison between rpoB and 16S rRNA Gene  
463 Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*  
464 2005;43:1934–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1934>.  
465
- 466 42. Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united  
467 database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol*  
468 *Microbiol*. 2017;67(5):1613-1617. doi:10.1099/ijsem.0.001755  
469  
470

### **3.3 Artigo 3: Potencial heterogênico de virulência, influência da multidroga-resistência e codificação de beta-lactamase classe A pelo gene *bla* de *Corynebacterium amycolatum* uropatogênicos durante a infecção por *Caenorhabditis elegans***

*Corynebacterium amycolatum* isoladas de infecções nosocomiais e comunitárias têm sido cada vez mais relatadas, juntamente com taxas de resistência a antimicrobianos relativamente altas. No entanto, estudos focados no potencial de virulência de *C. amycolatum* ainda são escassos. O nematoide *Caenorhabditis elegans* tem sido aplicado como um sistema modelo *in vivo* vantajoso para avaliar os mecanismos patogênicos de vários patógenos humanos, incluindo as corinebactérias. No presente estudo, a mortalidade e as alterações morfológicas foram investigadas em nematóides infectados por doze cepas de *C. amycolatum* isoladas de infecções do trato urinário (ITU) adquiridas na comunidade com diferentes perfis multidroga-resistentes (MDR) e multidroga-sensíveis (MDS). Seis dias após a infecção, todas as cepas de *C. amycolatum* testadas levaram a mais de 60% de mortalidade em nematódeos infectados. Todas as linhagens de *C. amycolatum* testadas foram capazes de induzir alterações morfológicas na região anal (fenótipo Dar) e eclosão interna de ovos (*bagging*) em *C. elegans*. Um modo incomum de infecção no hospedeiro nematódeo, estruturas semelhantes a cistos na região vulvar-útero (protrusão vulvar), foram observadas para alguns dos nematódeos expostos às cepas MDR BR-SW-28 e BR-SW-32, sugerindo infecção do útero por *C. amycolatum*. Além disso, todas as cepas testadas de *C. amycolatum* MDR mostraram aderência extracelular a células epiteliais humanas HEp-2 3h após a infecção, e padrões de aderência agregativa foram observados. Nossos dados fornecem evidências primárias da capacidade de *C. amycolatum* de interagir com células epiteliais humanas, indicando um mecanismo de colonização que pode auxiliar no estabelecimento de uma infecção. Além disso, a capacidade de induzir mudanças morfológicas e matar nematódeos em diferentes níveis de mortalidade indicam variabilidade no potencial de virulência de *C. amycolatum*.

1 **Heterogenic virulence potential, influence of multidrug resistance and *bla* gene coding**  
2 **class A beta-lactamase of *Corynebacterium amycolatum* uropathogens during infection of**  
3 ***Caenorhabditis elegans***

4

5 Sara W. C. Gomes<sup>1,2</sup>, Lorraine H. Heggendorn<sup>1,2</sup>, Lincoln de O. Sant'Anna<sup>1</sup>, Juliana Nunes  
6 Ramos<sup>1</sup>, Denise Braga Schmidt<sup>1,2</sup>, Vanilda Gonçalves Viana<sup>1</sup>, Mônica Cristina de Souza<sup>1</sup>, Ana  
7 Luíza de Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>, Louisy S. dos Santos<sup>1</sup>, Helvécio C. C. Póvoa<sup>2</sup>

8

9 Author affiliations:

10 <sup>1</sup>Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, The Collaborating Centre  
11 for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/ Ministry of Health -  
12 FNS/MS, Brazil- LDCIC/FCM/ UERJ, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de  
13 Janeiro – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3 andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ CEP  
14 20551-030, Brazil

15 <sup>2</sup> Laboratory of Experimental and applied Microbiology, Health Institute of Nova Friburgo,  
16 Federal Fluminense University, Brazil

17 **Corresponding author:** Louisy S. dos Santos, e-mail: [louisysanchesuerj@gmail.com](mailto:louisysanchesuerj@gmail.com)

18 **Abstract** *Corynebacterium amycolatum* strains isolated from nosocomial and  
19 communitary infections have been increasingly reported, along with relatively high antibiotic  
20 resistance rates. However, studies focused on the virulence potential of *C. amycolatum* remains  
21 scarce. *Caenorhabditis elegans* nematode have been applied as an advantageous *in vivo* model  
22 system to evaluate pathogenic mechanisms of several human pathogens, including  
23 corynebacteria. In the present study, mortality, and morphological changes were investigated  
24 in nematodes infected by twelve *C. amycolatum* strains isolated from community-acquired  
25 urinary tract infections (UTI) with different multidrug-resistant (MDR) and multidrug-  
26 susceptible (MDS) profiles. Six days post-infection, all tested *C. amycolatum* strains led to more  
27 than 60% mortality in infected worms. All *C. amycolatum* strains tested strains were capable of  
28 inducing morphological changes in the anal region (Dar phenotype) and internal egg hatching  
29 (bagging) in *C. elegans*. An unusual mode of infection on the nematode host, cyst-like structures  
30 in the vulvar-uterus region (vulvar protrusion), were observed for some of the exposed worms  
31 to MDR BR-SW-28 and BR-SW-32 strains, suggesting infection of the uterus by *C.*  
32 *amycolatum*. In addition, all MDR *C. amycolatum* tested strains showed extracellular adherence

33 to human epithelial Hep-2 cells 3h post-infection, and aggregative adherence patterns were  
34 observed. Our data provides primary evidence of the ability of *C. amycolatum* to interact with  
35 human epithelial cells indicating a colonization mechanism that may aid in the establishment  
36 of an infection. In addition, capability to induce nematode morphological changes and kill  
37 nematodes at different levels of mortality indicate variability in virulence potential of *C.*  
38 *amycolatum*.

39 **Keywords** *Corynebacterium amycolatum*, *Caenorhabditis elegans*, Virulence and  
40 multiresistance

41

## 42 **Introduction**

43 *Corynebacterium amycolatum* is one of most frequently isolated *Corynebacterium* spp.  
44 from clinical samples and has been recovered from endocarditis, bacteremia, septicemia,  
45 catheter-related infections, otitis, mastitis, and urinary tract infection (UTI), and commonly  
46 presents multidrug resistance (Martins et al. 2009; Funke; Bernard, 2015; Sengupta et al. 2015;  
47 Carvalho et al. 2018; Borde et al. 2020; Rasmussen et al. 2020; Yamamuro et al. 2021).

48 Despite the increasing frequency of MDR *C. amycolatum* strains isolated from several  
49 infections, it's virulence potencial remains weakly known. Recent studies have used the  
50 nematode *Caenorhabditis elegans*, as a host model to evaluate pathogenic mechanisms of  
51 several Gram-positive and Gram-negative human pathogens, including *Corynebacterium*  
52 species, like *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* and *C. striatum* (Antunes et al. 2016; Souza et al.  
53 2019).

54 Short life span, transparency, genetic tractability, and ease of culture using an *Escherichia*  
55 *coli* diet, are some of advantageous properties of *C. elegans* as a model system. Some pathogens  
56 are capable not only to colonize *C. elegans* but also evoke morphological changes as well as  
57 altered movement, like deformed anal region (Dar) morphology, aggregates of worms (Worm-  
58 star formation) and internal egg hatching (Worm bagging) (Ott et al. 2012; Antunes et al. 2016).

59 *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* induced slow star formation and a severe tail swelling  
60 phenotype 2 days post-infection of worms (Hodgkin et al. 2013; Antunes et al. 2016). Simpson-  
61 Lourêdo et al. (2019) observed that some of the exposed worms developed cyst-like structures  
62 in the vulvar-uterus region, an unusual mode of infection on the nematode host, suggesting  
63 infection of the uterus by *C. ulcerans*.

64 In addition, the HEp-2 cell model is traditionally used to determine patterns of adherence  
65 that can elucidate microorganisms mechanisms adherence to biotic and abiotic surfaces.

66 In the present study, the susceptibility of the soil nematode *C. elegans* to *C. amycolatum*  
67 of different multidrug resistance profiles, and Adherence to HEp-2 cells was investigated.

68

69 **Methods**

70

71 Bacterial strains and growth conditions

72

73 *C. amycolatum* strains used in this study are listed in Table 1. *C. amycolatum* strains and  
74 *Escherichia coli* OP50 were grown at 37°C in brain heart infusion (BHI) broth. *C. elegans* (WT)  
75 N2 was maintained and propagated on *E. coli* OP50 as previously described (Antunes et al.  
76 2016).

77

78 **Table 1.** Microbiological features of *Corynebacterium amycolatum* strains evaluated in  
79 this study previously isolated from outpatients with urinary tract infection in Nova  
80 Friburgo, Rio de Janeiro State, Brazil\*

<i>C. amycolatum</i> Clinical strains*	MALDI-TOF Score	Outpatients Sex/Age	Antibiotic resistance profiles	<i>bla</i> gene
BR-SW-14	2.268	F/90	MDR	+
BR-SW-33	2.399	F/49	MDR	+
BR-SW-23	2.092	F/53	MDR	+
BR-SW-27	1.818	M/56	MDR	+
BR-SW-28	2.231	F/48	MDR	+
BR-SW-04	2.274	F/31	MDR	+
BR-SW-25	2.306	F/56	MDR	+
BR-SW-32	1.940	F/48	MDR	-
BR-SW-29	1.937	F/3	MDR	-
BR-SW-84	2.197	F/75	MDR	-
BR-SW-08	2.203	F/55	MDS	-
BR-SW-43	2.160	F/69	MDS	-

81 MDR multidrug-resistant; MDS multidrug-susceptible. \**C. amycolatum* strains partially studied  
82 by Gomes et al. (2022).

83 The accession numbers of *bla* and 16S rRNA gene sequences of isolates BR-SW-04,  
84 BR-SW-14, BR-SW-23, BR-SW-25, BR-SW-27, BR-SW-28 and BR-SW-33 were deposited  
85 at GenBank under the accession ON630901, ON630902, ON630903, ON630904, ON630905,

86 ON630906, ON630907, ON605945, ON605946, ON605947, ON605948, ON605949,  
87 ON605950, ON605951.

88

89 *Caenorhabditis elegans* assays

90

91 *C. elegans* (N2) was maintained on agar plates inoculated with *Escherichia coli* strain  
92 OP50 for 6 to 7 days until the worms become starved, indicated by clumping behavior, as  
93 previously described (Ott, 2012; Antunes et al. 2016; Souza et al. 2019; Simpson-Louredo et  
94 al. 2019).

95 Briefly, twenty L4 stage larval worms per plate were infected with 20 $\mu$ L of each *C.*  
96 *amycolatum* strain and *E. coli* OP-50 (1.0 OD at  $\lambda=580\text{nm}$ ) at 20°C for 24h. For each strain,  
97 approximately 60 nematodes were used, and the assays were performed three times. Worms  
98 were observed each day following infection and dead nematodes were counted and removed  
99 every 24h. Kaplan–Meier survival analysis was used, and all statistical analyses were performed  
100 with GraphPad Prism 6.0 version. A *p*-value <0.05 was considered significantly different from  
101 the control. LT50, the time required to kill 50% of nematodes, was determined for all strains.  
102 Morphological changes of *C. elegans* during the interaction between nematodes and bacteria  
103 were inspected by light microscopy (Nikon C-DSD 230) and photographed: deformed anal  
104 region (Dar) morphology, aggregates of worms (Worm-star formation) and internal egg  
105 hatching (Worm bagging) (Antunes et al. 2016; Simpson-Louredo et al. 2019; Souza et al.  
106 2019).

107

108 Bacterial adherence patterns on HEp-2 cells

109

110 Analysis of the interaction of MDR *C. amycolatum* strains (n=6) with human HEp-2  
111 epithelial cell lines was based on earlier described methods, by using infected cells with  
112 microorganisms previously grown in trypticase soy broth and suspended in Eagle's minimum  
113 essential medium (MEM) (Sigma Chemical Co, MO, USA) [multiplicity of infection (MOI) of  
114 10] (Hirata Jr et al. 2002). Adherence assays were performed within semi-confluent HEp-2 cells  
115 grown on circular coverslips in MEM (13 mm diameter; Sigma, USA) supplemented with 5%  
116 fetal calf serum (Gibco-BRL, NY, USA), 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  gentamicin, 2.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  amphotericin B  
117 and 0.5% L-glutamine at 37°C in a 5% CO<sup>2</sup> atmosphere. Microorganisms were washed twice  
118 in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, 0.01 M; pH 7.2) and resuspended in MEM to a

119 concentration of  $10^7$  colony-forming units per mL, and used in adherence assays (3h  
120 incubation). Giemsa-stained coverslips were examined by bright field microscopy.  
121 Microorganisms were evaluated for their ability to display localized (LA; small clusters of  
122 bacteria resembling microcolonies), diffuse (DA; bacteria randomly distributed over HEp-2  
123 cells surfaces) or aggregative (AA; clumps of bacteria with a “stacked-brick” appearance)  
124 phenotypes. *C. diphtheriae* TR241 and HC01 strains were used as controls of LA and AA  
125 patterns, respectively (Hirata Jr et al. 2008; Souza et al. 2012).

126

127

## 128 **Results**

129

130 Survival of *C. elegans* in response to *C. amycolatum* infection

131

132 Figure 1 displays the frequency (%) of nematode survival induced by infection with  
133 multidrug-resistant (MDR) and multidrug-susceptible (MDS) *C. amycolatum* clinical isolates.

134 Six days post-infection, death of *C. elegans* nematodes was observed for all *C.*  
135 *amycolatum* strains tested, but at different levels (Fig. 1). The highest levels of mortality of  
136 nematodes were observed by MDR *C. amycolatum* BR-SW-27 (90%), BR-SW-28 (86%), BR-  
137 SW-14 (86%) and BR-SW-33 (84%) strains. All tested *C. amycolatum* strains led to more than  
138 60% mortality in infected worms, and median survival of worms (LT50s) ranged among 3 days  
139 (strain BR-SW-28) and 5 days (BR-SW-23 and BR-SW-43 strains).

140

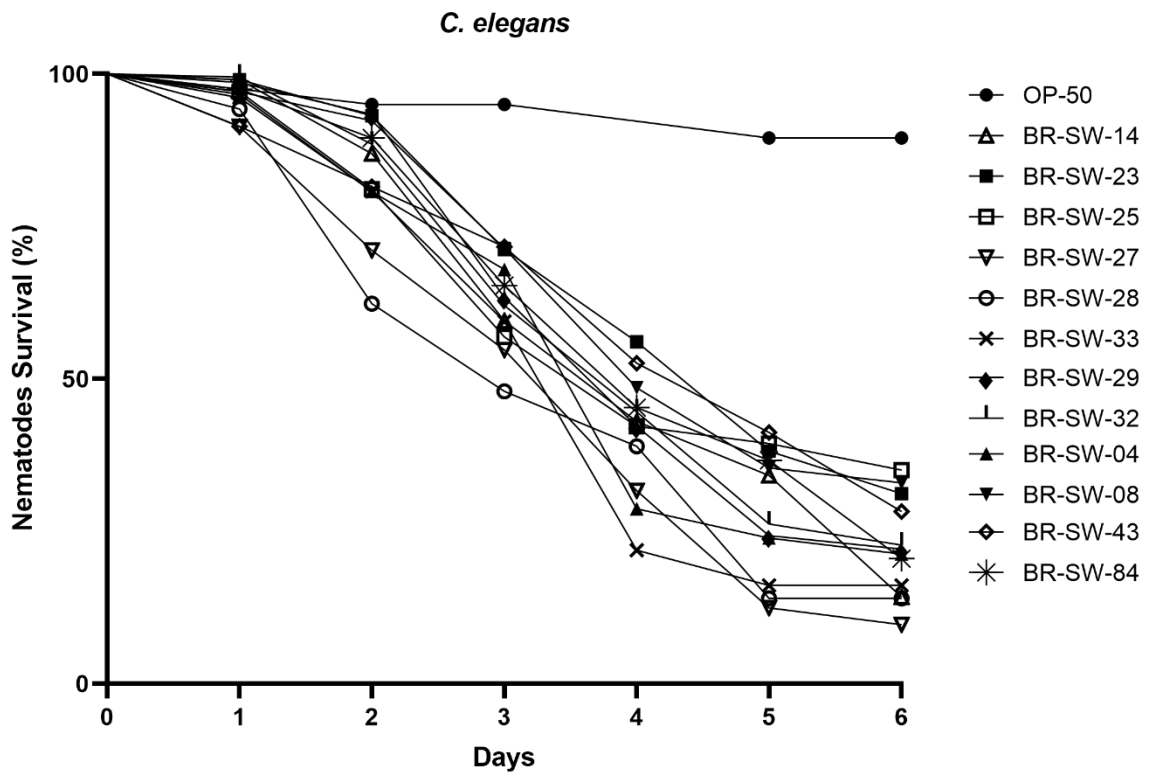
141 Morphological changes

142

143 *C. amycolatum* strains were able not only to infect and kill *C. elegans* but also induce  
144 morphological changes, as previously described for other nematode pathogens.

145 All *C. amycolatum* tested strains were capable of inducing morphological changes in  
146 the anal region (Dar phenotype) and internal egg hatching (bagging) in *C. elegans* (Fig. 2a, b).  
147 Interestingly, for MDR BR-SW-28 strain and MDR BR-SW-32 strain, some of the exposed  
148 worms developed cyst-like structures in the vulvar-uterus region (vulvar protrusion), an unusual  
149 mode of infection on the nematode host, suggesting infection of the uterus by *C. amycolatum*.  
150 (Fig.2c).





151  
152  
153  
154  
155  
156  
157

**Fig. 1** – *Caenorhabditis elegans* survival (%) due to 6 days infection by MDR- and MDS-*Corynebacterium amycolatum* strains. *Escherichia coli* OP50 non-pathogenic bacteria was used as negative control.



158  
159  
160  
161  
162  
163  
164

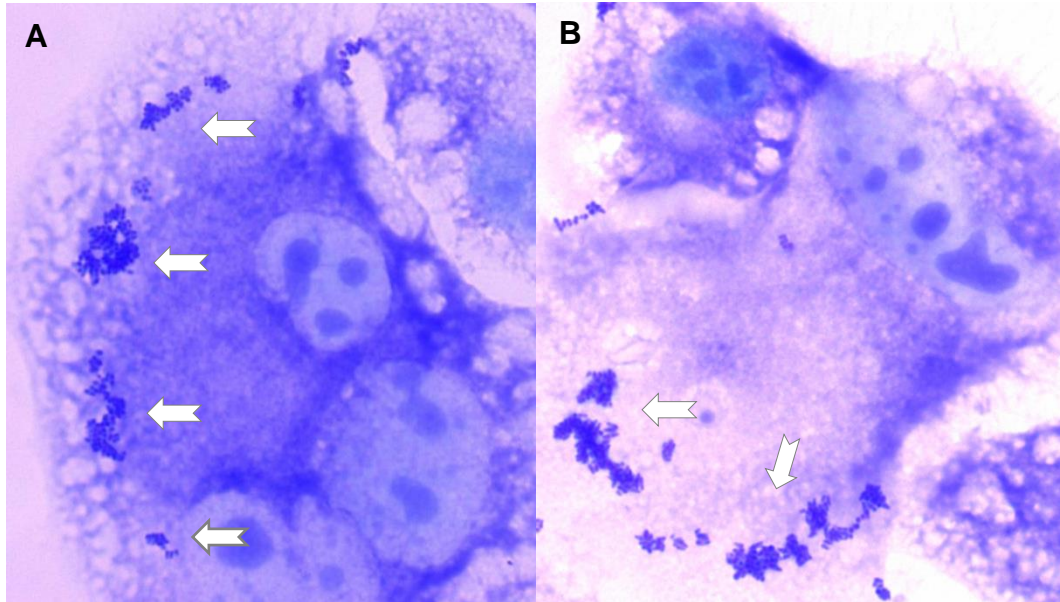
**Fig. 2** - Morphological changes in *Caenorhabditis elegans* induced by *Corynebacterium amycolatum* clinical isolates. **a** Tail swelling (Dar phenotype) (BR-SW-32); **b** “Bagging” (BR-SW-32); **c** cyst-like structures in the vulvar-uterus region (BR-SW-28).

165 *C. amycolatum* adherence patterns to HEp-2 epithelial cells related to virulence potential

166

167 All *C. amycolatum* tested strains showed the ability to adhere to human epithelial Hep-  
168 2 cells 3h post-infection, presenting an AA-pattern.

169



170

171 **Fig. 2-** Light micrographs illustrating human epithelial HEp-2 cells adherence  
172 pattern of clinical isolates of multidrug-resistant *C. amycolatum* strains. **a** and **b**:  
173 Agregative adherence pattern to human epithelial (HEp-2) cells, characterized by  
174 clumps of bacteria with a “stacked-brick” appearance, of MDR *C. amycolatum*,  
175 (circles)(3h), exemplified by BR-SW-04 and BR-SW-23 *C. amycolatum* strains,  
176 respectively; Magnification: 1000X.

177

178

179

180

## 181 Discussion

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

*Corynebacterium* species have been increasingly isolated from urine samples over the years indicating the important role of these bacteria in the urinary tract infection epidemiology, especially in women (Robert et al. 2018). *C. amycolatum*, a non-diphtheriae *Corynebacterium* specie, has been identified as etiologic agent of several infections in both immunocompromised and immunocompetent individuals, frequently presenting multidrug-resistant profiles (Sengupta et al. 2015; Carvalho et al. 2018; Borde et al. 2020; Dragomirescu et al. 2020; Rasmussen et al. 2020). A recent study reported *C. amycolatum* clinical strain resistant to daptomycin, a last-line drug for treatment of Gram-positive bacterial pathogens (Mitchell et al. 2021).

192

193

194

195

196

197

198

199

200

Recent data show that resistance rates of *Corynebacterium* species, including *C. amycolatum*, to beta-lactams, most broadly used class of antimicrobials, are relatively high (Neemuchwala et al. 2018; Abe et al. 2021). Most common mechanism of beta-lactams antibiotic resistance is hydrolysis of beta-lactam agents by beta-lactamases enzymes, which are classified by protein sequence in four molecular classes, A, B, C, and D, based on conserved and distinguishing amino acid motifs. In *C. striatum* strains, the *bla* gene encodes class A beta-lactamase and is responsible for penicillin resistance, whereas, *ampC* genes, widely distributed among the *Enterobacteriaceae*, encode class C beta-lactamase, responsible for cefotaxime resistance (Alibi et al. 2017).

201

202

203

204

Mechanisms involved on pathogenesis of infections caused by non-diphtheriae *Corynebacterium* spp., are very little known, but adherence to biotic and/or abiotic surfaces ability along with frequent multidrug resistance indicates their pathogenic potential (Carvalho et al. 2018; Ramos et al. 2019).

205

206

207

208

209

210

211

212

Strains investigated in our work were able not only to infect and to kill nematodes, but also induce morphological changes in *C. elegans*. Deformed morphology of the anal region, internal egg hatching and star formation, were morphological changes previously described in *C. elegans* by *C. striatum* infection (Souza et al. 2019). Some of the exposed worms to MDR BR-SW-28 strain and BR-SW-32 strain, developed cyst-like structures in the vulvar-uterus region (vulvar protrusion), an unusual mode of infection on the nematode host, suggesting infection of the uterus by *C. amycolatum*, also described for *C. ulcerans* (Simpson-Lourêdo et al., 2019).

213 Similarly to *C. striatum* strains from Alibi et al. (2021) work, our most virulent strains  
214 were multidrug-resistant, which may suggest association between virulence genes with  
215 resistance genes, but further studies are needed to confirm this hypothesis.

216 Although adhesion to the host cell be considered the initial step in host-pathogen  
217 interaction, is already know that adhesion of *C. diphtheriae* is a multi-factorial process witch  
218 strains that are able to adhere to the host cell do not necessarily invade the cell, and vice versa.  
219 *C. diphtheriae* is able to bind different epithelial cell types in a strain-specific manner and a  
220 several of proteins are involved in this process, such as, for example, MSCRAMMS proteins,  
221 that mediate attachment to fibrinogen or collagen, or proteins able to bind human erythrocytes,  
222 and then to spread throughout the whole body via the blood stream Is already known that  
223 deletion or disruption of proteins involved in this process, does not lead to a complete loss of  
224 the adhesion ability, indicating that a combination of proteins may be crucial for this event (Ott,  
225 2018). Previous studies demonstrated that distinct corynebacterial pili mediated specific  
226 adhesion to host cells, for example, *Spa A* pili display specificity for binding to pharyngeal  
227 epithelial cells, while *SpaD* pili mediate specific adhesion to lung and laryngeal epithelial cells  
228 (Ton-That et al. 2003; Mandlik et al. 2007). Cell surface pili are also implicated in the invasion,  
229 colonization of host cells, evasion of the immunity, and the development of biofilms (Ramos et  
230 al. 2018). In addition, it seems that the structure of the *Corynebacterium* spp. cell wall, with  
231 different types of long chain corynomycolic acids, along with hydrophobicity of the cell wall  
232 may play a major role in bacterial adhesion to inert surfaces and spread of bacteria and  
233 promotion biofilm formation especially under conditions of developing infection in the  
234 presence of serum, and on iron limiting conditions (Olson et al. 2002).

235 Tested strains exhibited aggregative adherence patterns to human epithelial cells. HEp-  
236 2 cell line have been described as a useful *in vitro* model for investigating the pathogenic  
237 potential of several bacterial species, including *Corynebacterium* spp. Aggregative-like  
238 adherence (AA) pattern has been correlated with the invasive potential and intracellular  
239 survival, and also with the ability to adhere to abiotic surfaces and form biofilms (Hirata Jr et  
240 al. 2008; Ramos et al. 2019).

241 In conclusion, our work demonstrated the importance of surveillance of MDR *C.*  
242 *amycolatum* strains in the community environment, as they were able to adhere specifically to  
243 human epithelial cells and kill nematodes. These data may contribute to a better understanding  
244 of *C. amycolatum* pathogenicity mechanisms and better management of infections caused by  
245 them.

246

247 **Conflicts of interest**

248 The authors declare that there are no conflicts of interest.

249

250

251 **Funding information**

252 This study was supported by the:

253 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, Fundação de

254 Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, Conselho Nacional de

255 Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Sub-Reitoria de Pós-graduação e

256 Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR-2/ UERJ).

257

258

259 *Ethics in research*

260 This study takes part of the main project of LDCIC laboratory that includes diagnosis activities

261 without direct human patient contact. (I) The project (CAAE 25847614.8.0000.5259) was

262 approved by the Research Ethics Committee of Hospital Universitário Pedro

263 Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Written informed consent for participation

264 was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional

265 requirements, and the investigated isolate was taken as a part of standard care (diagnostic

266 purposes); (II) Moreover, this collaborative study, which did not directly involve any human or

267 animal participants, was also approved by the Research Ethics Committee of Fluminense

268 Federal University (CAAE: 67843417.1.0000.5626), since did not contain any human or animal

269 participants.

270

271 **References**

272

273 Abe M, Kimura M, Maruyama H, Watari T, Ogura S et al (2021) Clinical characteristics and  
 274 drug susceptibility patterns of *Corynebacterium* species in bacteremic patients with  
 275 hematological disorders. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*  
 276 <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04257-8>

277 Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M et al (2017) Occurrence of  
 278 *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in  
 279 a Tunisian hospital. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10081-y>

280 Alibi S, Ramos-Vivas J, Selma WB, Mansour HB, Boukadida J et al (2021) Virulence of  
 281 clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their  
 282 ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces. *Microb. Pathog.*  
 283 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104887>

284 Antunes CA, Clark L, Wanuske MT, Hacker E, Ott L et al (2016) *Caenorhabditis elegans* star  
 285 formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria.  
 286 *Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/mic.0.000201>

287 Borde K, Rao V, Shah M, Pavani N, Anand M (2020) Not always a commensal: A case of  
 288 mastitis by *Corynebacterium amycolatum*. *IDCases.*  
 289 <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00728>

290 Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA (2003) Nondiphtherial  
 291 *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university  
 292 hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol.* <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000100009>

294 Carvalho RV, Lima FFS, Santos CS, Souza MC, Silva RS et al (2018) Central venous  
 295 catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other  
 296 multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Braz J*  
 297 *Infect Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.004>

298 Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (2018) Performance Standards for  
 299 Antimicrobial Susceptibility Testing. 30<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA,  
 300 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

301 Dragomirescu CC, Lixandru BE, Coldea IL, Corneli ON, Pana M et al (2020) Antimicrobial  
 302 susceptibility testing for corynebacterium species isolated from clinical samples in  
 303 Romania. *Antibiotics.* <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010031>

304 Funke G, Bernard KA (2011) Coryneform Gram-positive rods. *Manual of clinical*  
 305 *microbiology.* <https://doi.org/10.1128/9781555816728.ch26>

306 Gomes SWC et al (2022) Community-Acquired Urinary Tract Infections In Adults and  
 307 Children Due To *Corynebacterium amycolatum*, Including Multidrug-Resistant and  
 308 *Bla* Gene-Positive Strains. *IJSRM. HUMAN.* vol.22 (2): 38-58.

309 Hirata Jr R, Napoleão F, Monteiro-Leal LH, Andrade AF, Nagao PE et al (2002) Intracellular  
 310 viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS*  
 311 *Microbiol Lett.* <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11379.x>

312 Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DLR, Damasco PV et al (2008) Potential  
 313 pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different  
 314 clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res.* <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008001100007>

316 Hodgkin J, Félix MA, Clark LC, Stroud D, Gravato-Nobre MJ (2013) Two *Leucobacter* strains  
 317 exert complementary virulence on *Caenorhabditis* including death by worm-star  
 318 formation. *Curr Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.060>

319 Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, et al (2012) Multidrug-  
 320 resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international

- 321 expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol  
322 Infect. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- 323 Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H (2007) *Corynebacterium diphtheriae* employs  
324 specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. Mol Microbiol.  
325 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05630.x>.
- 326 Martins CAS, Faria LD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E et al (2009) Microbiological and  
327 host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study.  
328 Mem Inst Oswaldo Cruz. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600015>
- 329 Mitchell KF, McElvania E, Wallace MA, Droske LE, Robertson AE et al (2021) Evaluating the  
330 rapid emergence of daptomycin resistance in *Corynebacterium*: A multicenter study.  
331 J Clin Microbiol. <https://doi.org/10.1128/JCM.02052-20>
- 332 Neemuchwala A, Soares D, Ravirajan V, Marchand-Austin A, Kus JV et al (2018) In Vitro  
333 Antibiotic Susceptibility Pattern of Non-diphtheriae *Corynebacterium* Isolates in  
334 Ontario, Canada, from 2011 to 2016. Antimicrob Agents Chemother.  
335 <https://doi.org/10.1128/AAC.01776-17>
- 336 Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR (2002) Biofilm bacteria: formation and  
337 comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res 66:86
- 338 Ott L (2018) Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. AIMS Microbiol.  
339 <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.85>
- 340 Ott L, McKenzie A, Baltazar MT, Britting S, Bischof A et al (2012) Evaluation of invertebrate  
341 infection models for pathogenic corynebacteria. FEMS Immunol Med Microbiol.  
342 <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00963.x>
- 343 Ramos JN, Rodrigues IDS, Baio PVP, Veras JFC, Ramos RTJ et al (2018) Genome sequence  
344 of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream  
345 infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo  
346 Cruz. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180051>
- 347 Ramos JN, Souza C, Faria YV, Silva EC, Veras JFC et al (2019) Bloodstream and catheter-  
348 related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer  
349 *Corynebacterium striatum*. BMC Infect Dis. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4294-7>
- 350
- 351 Rasmussen M, Mohlin AW, Nilson B (2020) From contamination to infective endocarditis—a  
352 population-based retrospective study of *Corynebacterium* isolated from blood  
353 cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. [https://doi.org/10.1007/s10096-019-03698-](https://doi.org/10.1007/s10096-019-03698-6)  
354 [6](https://doi.org/10.1007/s10096-019-03698-6)
- 355 Robert K, Anna SG, Grażyna M (2018) *Corynebacterium* Species Causing Urinary Tract  
356 Infections. Microbiol Res J Int. <https://doi.org/10.9734/MRJI/2018/43099>
- 357 Sengupta M, Naina P, Balaji V, Anandan S (2015) *Corynebacterium amycolatum*: an  
358 unexpected pathogen in the ear. JCDR.  
359 <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/15134.7002>
- 360 Simpson-Lourêdo L, Silva CM, Hacker E, Souza NF, Santana MM et al (2019) Detection and  
361 virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a  
362 concurrent diphtheria and infectious mononucleosis case. Antonie Leeuwenhoek.  
363 <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01240-4>
- 364 Souza C, Mota HF, Faria YV, Cabral FDO, Oliveira DRD (2020) Resistance to antiseptics and  
365 disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum*.  
366 Microb Drug Resist. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0124>
- 367 Souza C, Simpson-Louredo L, Mota HF, Faria YV, Cabral FDO et al (2019) Virulence potential  
368 of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. Antonie Leeuwenhoek.  
369 <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01265-9>

- 370 Souza MC, Santos LS, Gomes DLR, Sabbadini PS, Santos CS et al (2012) Aggregative adherent  
371 strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2  
372 epithelial cells. Mem Inst Oswaldo Cruz. [https://doi.org/10.1590/S0074-](https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400008)  
373 [02762012000400008](https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400008)
- 374 Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC et al (2012) Formic acid-based  
375 direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper  
376 matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin  
377 Microbiol. <https://doi.org/10.1128/JCM.01045-12>
- 378 Ton-That H, Schneewind O (2003) Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium*  
379 *diphtheriae*. Mol Microbiol. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03782.x>
- 380 Yamamuro R, Hosokawa N, Otsuka Y, Osawa R (2021) Clinical characteristics of  
381 *corynebacterium* bacteremia caused by different species, Japan, 2014–2020. Emerg  
382 Infect Dis. <https://doi.org/10.3201/eid2712.210473>  
383
- 384
- 385
- 386



## 4 DISCUSSÃO

As ITUs estão entre as infecções mais comuns em ambientes ambulatoriais e hospitalares e representam uma proporção importante dos custos de saúde como resultado de consultas ambulatoriais, testes diagnósticos e prescrições (BUTLER et al., 2015; GUPTA; GRIGORYAN; TRAUTNER, 2017).

Os resultados epidemiológicos deste estudo apresentaram as mulheres (97.37%) como grupo mais vulnerável à ITU, quando comparadas aos homens, como já esperado, devido a fatores anatômicos e fisiológicos (VASUDEVAN, 2014). Estima-se que as ITUs agudas não complicadas atinjam aproximadamente 10% das mulheres a cada ano e 60% das mulheres pelo menos uma vez na vida. A prevalência de infecção do trato urinário é alta no sexo feminino em comparação ao masculino. O pico da frequência de ITUs não complicadas ocorre durante os anos de atividade sexual máxima, geralmente entre 18 e 39 anos, e estimativas mostram que um terço das mulheres adultas são diagnosticadas com ITU antes dos 24 anos. As recorrências são comuns, com quase metade das pessoas sendo acometidas por uma segunda infecção dentro de um ano, com terapia antimicrobiana frequentemente prescrita (ALÓS, 2005; FOSTER SR, 2008; JOHN; MBOTO; AGBO, 2016; LEE et al., 2017; MEDINA; CASTILLO-PINO, 2019; NICOLLE, 2008; STAPLETON et al., 2012).

As taxas de bacteriúria aumentam com a idade de 2-7% em mulheres em idade fértil para até 50% em mulheres idosas (DIELUBANZA; SCHAEFFER, 2011). Estima-se que cerca de 40% das mulheres acometidas por ITU, experimentarão uma recorrência, com aproximadamente 10% delas causadas pela cepa original do episódio anterior (GONEAU et al., 2015).

A carga de ITUs recorrentes tem aspectos pessoais e sociais, como ansiedade e depressão. O início súbito, rápido e doloroso de uma ITU é muitas vezes uma fonte de ansiedade nos pacientes. O impacto social das ITUs recorrentes pode ser particularmente acentuado em mulheres que trabalham na pré-menopausa. Nos idosos, as recorrências aliadas a questões como incontinência, geram um impacto substancial na saúde geral, associado a uma carga psicológica significativa. Além disso, os custos podem ser diretos e indiretos: o absentismo no trabalho, por exemplo, pode afetar tanto a economia quanto a sensação de bem-estar do paciente. Os custos incluem aqueles associados a consultas médicas (para pacientes ambulatoriais), prescrições de antimicrobianos, despesas hospitalares, custos não relacionados a viagens

médicas, dias de licença médica devido à doença e tratamento de comorbidades relacionadas (MEDINA; CASTILLO-PINO, 2019; RENARD et al., 2015).

Os indivíduos idosos representaram 28.95% dos indivíduos acometidos neste estudo. Esta faixa etária corre um risco particularmente alto de desenvolver ITU devido a uma série de deficiências, como incontinência, imobilidade e comprometimento cognitivo (KIM et al., 2019). A correta identificação e manejo da ITU nesses pacientes pode ser desafiador devido aos sinais e sintomas atípicos de infecção frequentemente apresentados por esse grupo. A preocupação é acentuada quando a ausência de tratamento antibiótico imediato para ITU pode levar a uma infecção da corrente sanguínea (SHALLCROSS et al., 2020).

Entre 50-60% das mulheres adultas terão pelo menos uma ITU na vida, e cerca de 10% das mulheres na pós-menopausa indicam que tiveram ITU no ano anterior (ALÓS, 2005; MEDINA; CASTILLO-PINO, 2019).

O fator de risco específico da idade mais significativo para ITUs em mulheres é o estrogênio. A proliferação de lactobacilos e o pH vaginal ácido agem como as defesas mais fortes do hospedeiro contra a colonização de patógenos. No entanto, no momento da menopausa, os níveis de estrogênio diminuem, resultando no afinamento do epitélio vaginal e diminuição da quantidade de glicogênio. O ambiente resultante é geralmente hostil aos lactobacilos, diminuindo assim seus números, facilitando a conversão da microbiota vaginal de *Lactobacillus* spp. a *E. coli* ou outros membros da família *Enterobacteriaceae*, favorecendo infecções.

A reposição de estrogênio tópico, mas não o estrogênio oral, demonstrou reduzir o risco de ITU em mulheres na pós-menopausa. Em um estudo randomizado com 93 mulheres na pós-menopausa com histórico de ITU recorrente, o creme de estriol intravaginal aplicado topicamente (0,5 mg de estriol todas as noites por 2 semanas, depois duas vezes por semana por 8 meses) reduziu significativamente a incidência de ITU em comparação com placebo (0,5 versus 5,9 episódios por paciente-ano, respectivamente [ $P < 0,001$ ]) (RAZ; STAMM, 1993). As mulheres tratadas com creme de estrogênio tiveram um aumento na prevalência de *Lactobacillus* spp. e uma diminuição na colonização vaginal por *E. coli*. Outro estudo randomizado em mulheres na pós-menopausa com ITU recorrente comparando um anel vaginal liberador de estrogênio (*Estring*) para nenhum tratamento com estrogênio em 103 mulheres com mais de 36 semanas encontrou uma proporção significativamente maior de mulheres que permanecem livres de ITU no grupo estrogênio (45%) versus 20% no grupo controle ( $P = 0,008$ ) (ERIKSEN, 1999). Em contraste, um estudo de pessários vaginais contendo estriol aplicado duas vezes por semana em comparação com nitrofurantoína uma vez ao dia em 171 mulheres

na pós-menopausa encontrou uma taxa significativamente maior de ITU sintomática no grupo de estrogênio (67%) em comparação com o grupo de nitrofurantoína (52%) (RAZ et al., 2003).

No Brasil, enterobactérias, tais como *E. coli*, permanecem como os principais uropatógenos, (CUNHA et al., 2016; GOMES et al., 2017; MIRANDA et al., 2014). No que tange a América Latina, os dados se assemelham. Em um estudo colombiano com gestantes, a BA foi encontrada em 10,6% das participantes, sendo *Escherichia coli* uropatogênica (*Uropathogenic Escherichia coli* - UPEC) o patógeno mais comum (25%), seguido por *E. faecalis* (20,8%) (CAMPO-URBINA et al., 2017). Em outro trabalho colombiano, os principais agentes causadores foram *E. coli* (69%), *Enterococcus* spp. (11%), e *Klebsiella* spp. (8%) (ORREGO-MARIN; HENAO-MEJIA; CARDONA-ARIAS, 2014). De forma geral, diferentes espécies que expressam perfis de MDR têm sido cada vez mais relatadas em infecções adquiridas na comunidade ao redor do mundo, embora a prevalência varie por região (MAHONY et al., 2020; DAYAN et al., 2013; JO et al., 2021).

No entanto, bactérias Gram-positivas como *Enterococcus* spp.; *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*; *S. saprophyticus*, *S. aureus* e *S. hominis* têm sido relatadas como agentes causadores de ITU em pacientes internados e ambulatoriais. Pacientes idosos, grávidas ou outros que possuem risco para ITU parecem ser mais suscetíveis a esses microrganismos (KLINE; LEWIS, 2016; GAJDÁCS et al., 2020; MAHONY et al., 2020).

*Corynebacterium* spp. não produtoras de TD e outros BGPI, geralmente chamados de corineformes, são frequentemente encontrados como constituintes da microbiota humana. No entanto, alguns deles têm sido cada vez mais relatados mundialmente como agentes causadores de diversas infecções humanas (GHERARDI et al., 2015).

No presente estudo, BGPI do gênero *Corynebacterium* spp. representaram 23% dos agentes causadores de ITU ambulatorial, sendo a maioria dos isolados clínicos identificados como *C. amycolatum* (60.31%).

Durante as últimas décadas, as investigações têm demonstrado uma frequência alarmante de resistência antimicrobiana entre as espécies patogênicas de *Corynebacterium* não produtoras de TD (BAIO et al., 2013; CAMELLO et al., 2003; CARVALHO et al., 2018; DRAGOMIRESCU et al., 2020; MARTINS et al. 2009; RAMOS et al., 2019; RENOM et al. 2007; SOUZA et al., 2015).

Atualmente, espécies como *C. amycolatum* têm sido cada vez mais recuperadas de espécimes clínicos, como pontas de cateteres, amostras de urina e pus, e reconhecidas como potenciais patógenos, especialmente em pacientes debilitados e como patógenos adquiridos em hospitais (BORDE et al., 2020; CARVALHO et al., 2018; HILT et al., 2014).

O presente estudo mostrou uma taxa alarmante de cepas de *C. amycolatum* isoladas de uroculturas provenientes de pacientes da comunidade, expressando perfis MDR heterogêneos (86.84%), apresentando o gene *bla* codificador de beta-lactamase classe A envolvida na resistência a penicilinas e cefalosporinas.

Embora a aquisição de resistência seja um processo natural, o uso indevido de antimicrobianos na prática humana e veterinária, vigilância inadequada e a regulação mal controlada de antimicrobianos na medicina clínica e na pecuária exacerbaram o aparecimento e a disseminação de microrganismos MDR (FURUYA; LOWY, 2006). A resistência antimicrobiana pode ser uma característica inata de um microrganismo ou pode resultar de mutação ou aquisição de genes de resistência exógenos, e ocorre como resultado da alteração do alvo, diminuição do acúmulo de drogas e modificação da droga, (POOLE, 2005; LINHARES et al., 2015).

A hidrólise de antimicrobianos beta-lactâmicos por enzimas beta-lactamases, mecanismo de resistência mais comum para esta classe de agentes antimicrobianos, também foi observada anteriormente entre cepas de *C. striatum*. Os dados também revelaram altas taxas de resistência aos beta-lactâmicos e alta prevalência dos genes *bla* e *ampC* entre isolados clínicos de *C. striatum* de uma unidade hospitalar localizada na Tunísia (ALIBI et al., 2017).

O crescente número de relatos de infecções relacionadas a diferentes e novas espécies de *Corynebacterium* tem sido favorecido por estudos de genotipagem e taxonomia, técnicas de identificação laboratorial e/ou condições de sobrevivência de pacientes imunocomprometidos (GHERARDI et al., 2015).

Por muitas décadas, o potencial patogênico de espécies não diftéricas de *Corynebacterium* foi negligenciado, principalmente pela dificuldade de identificação e distinção entre colonização e infecção (CAMELLO et al. 2003; MARTINS et al. 2009). No entanto, espécies de *Corynebacterium* identificadas durante procedimentos laboratoriais permanecem frequentemente consideradas como contaminantes de espécimes clínicos e/ou subestimadas por uma variedade de profissionais de saúde em muitos países (BAIO et al., 2013; BERNARD et al., 2013; ZASADA; MOSIEJ 2018).

Uma vez isolados e devidamente reconhecidos como agentes causadores de infecções, a correta identificação desses microrganismos é o próximo e desafiador passo do processo. Mas a identificação deste grupo de bactérias ao nível de espécie continua difícil. Atualmente, estão disponíveis vários ensaios manuais, semiautomatizados e automatizados usados em laboratórios clínicos para identificação microbiológica de *Corynebacterium* spp.. Os sistemas para identificação de isolados bacterianos disponíveis no mercado utilizados na maioria dos

laboratórios clínicos são baseados em diferentes abordagens como reações bioquímicas, análise de ácidos graxos e sequenciamento de DNA. Dentre esses, sistemas de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) e ensaios baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento tem sido amplamente utilizados na identificação de *Corynebacterium* spp. a nível de espécie (ZASADA; MOSIEJ, 2018).

Desde que foi inventada, na década de 1980, a PCR tem sido aplicada para detecção de DNA bacteriano diretamente em amostras clínicas, bem como para identificação e caracterização de microrganismos cultivados. No que se refere às infecções por *Corynebacterium* spp., o ensaio tem sido usado por muitos laboratórios em todo o mundo para a identificação de corinebactérias potencialmente produtoras de TD. Desde então, diversas abordagens baseadas em PCR para detecção do gene *tox* e outros marcadores genéticos para identificação de corinebactérias potencialmente produtoras de TD foram propostas e descritas (HAUSER et al., 1993; MOTHERSHED et al., 2002; PACHECO et al., 2007; PALLEN, 1991; PIMENTA et al., 2008; SCHUHEGGER et al., 2008; SING et al., 2011). Ensaios combinados de PCR em tempo real e PCR multiplex para a detecção e diferenciação de corinebactérias toxigênicas e não toxigênicas: também foram descritos (MANCINI et al., 2012; TORRES et al., 2013). O ensaio de PCR em tempo real é baseado nos genes *tox* e *rpoB*, enquanto o ensaio de PCR multiplex é baseado em *rpoB*, 16S rRNA, *pld*, *dtxR* e *tox* (ZASADA; MOSIEJ, 2018).

Ensaios baseados em PCR para identificação de corinebactérias clinicamente relevantes, além das espécies potencialmente produtoras de TD, são escassos na literatura. Foi desenvolvida PCR para amplificação da região do gene *divIVA* de divisão celular que permite distinguir *C. amycolatum* de *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. xerosis*, espécies intimamente relacionadas (LETEK et al., 2006). A PCR em tempo real baseado em um gene de polifosfato quinase para diferenciação das espécies resistentes a antimicrobianos *C. jeikeium* e *C. urealiticum* de outras espécies de *Corynebacterium* também foi descrito (CAZANAVE et al., 2012). Apesar de kits comerciais de PCR e PCR em tempo real para detecção de vários patógenos estarem disponíveis no mercado atualmente, nenhum deles é dedicado à detecção ou identificação de espécies de *Corynebacterium* (ZASADA; MOSIEJ, 2018).

O padrão-ouro para a identificação de espécies de *Corynebacterium* é sequenciamento do gene *rpoB* que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase dependente de DNA. Entretanto, além de ser demorado e caro, o método requer pessoal especialmente treinado (ALATOOM et al., 2012). Devido ao fato do gene 16S rRNA de *Corynebacterium* spp. apresentar baixo polimorfismo, o sequenciamento completo do gene 16S rRNA (c. 1500 pb) é necessário para uma identificação molecular precisa (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2005). O estudo

realizado por Khamis e colaboradores (2005) mostrou maiores taxas de identificação de espécies de *Corynebacterium* spp. para sequenciamento de *rpoB* (91%) em comparação com a identificação baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA (81%). O sequenciamento do gene *rpoB* e do gene 16S rRNA é útil para resolver casos ambíguos para identificação definitiva (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2005; SUWANTARAT et al., 2016). No entanto, geralmente não é usado por laboratórios de diagnóstico de rotina e até o momento apenas um sistema de sequenciamento baseado no gene 16S rRNA (MicroSeq 500; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) está comercialmente disponível e validado para uso em diagnóstico clínico. Mas a interpretação dos resultados está limitada às espécies incluídas na base de dados do sistema (ZASADA; MOSIEJ, 2018).

O MALDI-TOF MS é uma tecnologia baseada em perfis de proteínas e está se tornando rotineiramente usada para identificação de *Corynebacterium* spp. em laboratórios de microbiologia. Diferentes sistemas para identificação microbiana foram desenvolvidos, incluindo o MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e o sistema Andromas (Andromas SAS, Paris, França) (FARFOUR et al., 2012; SCHULTHESS et al., 2014). Os sistemas de identificação MALDI-TOF MS diferem principalmente nos procedimentos de preparação das amostras, na cobertura de espécies do banco de dados de referência e no algoritmo de identificação do software (BILLE et al., 2012; CARBONNELLE et al., 2012; DUBOIS et al., 2012; MARTINY et al., 2012).

Estudos mostraram que a maioria das espécies de *Corynebacterium* são corretamente identificadas nos níveis de gênero e espécie. Taxas de identificação de espécies de *Corynebacterium* spp. pelo MALDI-TOF MS foram semelhantes ou superiores em comparação com métodos fenotípicos convencionais (ALIBI et al. 2015; BARBERIS et al. 2014; THEEL et al., 2012; VILA et al. 2012).

Uma limitação do MALDI-TOF Bruker Biotyper consiste na falta de inclusão várias espécies de *Corynebacterium* e outros corineformes, e de novas espécies no banco de dados comercial, enquanto algumas espécies são representadas por isolados únicos (SCHULTHESS et al., 2014).

A maioria dos laboratórios de microbiologia de rotina tem problemas em distinguir entre *Corynebacterium* spp. e outros corineformes. A análise da composição de ácidos graxos celulares e o sequenciamento de DNA parecem ser as abordagens mais úteis para diferenciar gênero *Corynebacterium* dos demais corineformes. No entanto, testes diagnósticos convencionais, como morfologia colonial e celular, coloração de Gram, teste CAMP, odor, testes bioquímicos, também podem ser úteis (FUNKE et al., 1997; BERNARD; FUNKE, 2012).

Neste trabalho, o MALDI-TOF identificou *Brevibacterium ravensturgense*, outro corineforme, sendo pela primeira vez isolado de uma amostra de urina no Brasil, juntamente com *Corynebacterium amycolatum* e *E. coli*, todos apresentando perfis MDR. O gênero *Brevibacterium* compreende organismos aeróbios, na maioria das vezes associados ao leite e raramente descritos como patógenos oportunistas. No entanto, alguns deles já foram associados a infecções invasivas, como bacteremia, endocardite e osteomielite, principalmente em pacientes imunocomprometidos (ASAI et al., 2019; BAL et al., 2015; BENSON; TATEM, 2021; EIDENSOHN et al., 2021; OCHI et al., 2021).

Desde que foi descrito por Mages e colaboradores (2008), derivado de uma ferida e de uma cultura de sangue humano, *B. ravensturgense* é raramente relatado como isolado clínico na literatura, ao contrário de outras espécies do gênero, como *B. casei*, comumente relatada como agente de infecções da corrente sanguínea. Um esboço da sequência do genoma de uma cepa de *B. casei* isolada de uma infecção sanguínea previu 48 genes envolvidos na resistência a antimicrobianos (incluindo vancomicina, fluoroquinolonas e beta-lactâmicos) e compostos tóxicos (metais pesados), 16 genes envolvidos na invasão e resistência intracelular (Operons de virulência do *Mycobacterium*), e 94 genes envolvidos na resposta ao estresse (osmótico, estresse oxidativo, frio e choque térmico) (OLENDER et al., 2020).

O sequenciamento metagenômico está revolucionando a detecção e caracterização de espécies microbianas, e uma grande variedade de ferramentas de software está disponível para realizar a classificação taxonômica desses dados (SIMON et al., 2019).

O objetivo da identificação taxonômica de sequências metagenômicas é encontrar as espécies exatas de origem, cujos dados também são realizados principalmente com o objetivo de classificar/catalogar vários grupos microbianos que habitam um determinado ambiente (ROSEN; REICHENBERGER; ROSENFELD, 2011; VERVIER et al., 2016). A descoberta de novos táxons e revisões da nomenclatura procariótica geralmente decorre de estudos de microbioma humano ou avanços em tecnologias relativas ao sequenciamento do genoma microbiano, alguns dos quais agora são comumente implementados no laboratório de microbiologia clínica de rotina (MUNSON; CARROLL, 2021).

A identificação taxonômica é um procedimento crucial para diferentes aplicações da metagenômica e o conhecimento da nomenclatura taxonômica atual tem a capacidade de influenciar o diagnóstico de doenças e as opções de teste de suscetibilidade antimicrobiana, esclarecendo os papéis da patogenicidade microbiana, e na epidemiologia atuando no rastreamento de surtos. Os algoritmos de identificação taxonômica atuais utilizam principalmente recursos artesanais de composição de sequência, como frequência de

oligonucleotídeos (CLSI, 2015; 2020; LAU et al., 2015; POTTER; BURNHAM; DANTAS, 2019; ROSEN; REICHENBERGER; ROSENFELD, 2011; VERVIER ET AL., 2016).

Técnicas de sequenciamento de DNA de nova geração combinadas com novos avanços computacionais em montagem, anotação e análise comparativa resultaram em uma imensidão de dados disponíveis, permitindo análise de centenas de genomas simultaneamente (ANSORGE, 2009; OLIVEIRA et al., 2017). Dessa maneira, é possível não apenas observar as diferenças existentes dentro de isolados específicos, mas também esclarecer o processo evolutivo em amplos níveis taxonômicos, além de ampliar a compreensão da estrutura cromossômica e do papel desempenhado pela transferência horizontal (ALFÖLDI; LINDBLAD-TOH, 2013; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000). Comparações amplas entre bactérias que causam doenças com seus parentes mais próximos podem destacar os genes e sequências que desempenham um papel na patogenicidade (COHEN et al., 2015; PAPAVENTSIS et al., 2017).

Análises metagenômicas do microbioma intestinal permitiram explorar este reservatório potencial para patógenos resistentes. Vários estudos aplicaram recentemente sequenciamento metagenômico e metagenômica funcional para sondar o resistoma no intestino de indivíduos saudáveis e hospitalizados. Esses avanços provavelmente facilitarão a caracterização do resistoma por sequenciamento metagenômico em pacientes hospitalizados, guiando a escolha de antimicrobianos para terapia mais eficiente (BUELOW et al., 2014; FORSLUND et al., 2013; HU et al., 2013; PÉREZ-COBAS et al., 2013; SOMMER; DANTAS, G.; CHURCH, 2009; VRIE et al., 2011).

A adesão do patógeno à célula hospedeira representa um processo crucial para a colonização e estabelecimento da infecção, embora já se saiba que a adesão de *C. diphtheriae* é um processo multifatorial, onde cepas capazes de aderir à célula hospedeira não necessariamente invadem a célula, e vice-versa. *C. diphtheriae* é capaz de se ligar a diferentes tipos de células epiteliais de uma maneira específica, e várias proteínas estão envolvidas nesse processo, como, por exemplo, proteínas da família MSCRAMMS, que medeiam a ligação ao fibrinogênio ou colágeno, ou proteínas capazes de se ligar eritrócitos humanos, e depois se espalhar por todo o corpo através da corrente sanguínea. Já se sabe que a deleção ou ruptura das proteínas envolvidas neste processo, não leva à perda completa da capacidade de adesão, indicando que uma combinação de proteínas pode ser crucial para este evento (OTT, 2018). Estudos anteriores demonstraram que *pili* de corinebactérias distintos medeiam a adesão específica às células hospedeiras. Por exemplo, os *pili Spa A* exibem especificidade para a ligação às células epiteliais da faringe, enquanto os *pili SpaD* mediam a adesão específica às



células epiteliais do pulmão e da laringe (MANDLIK et al., 2007; TON-THAT et al., 2003). Os *pili* da superfície celular também estão implicados na invasão, colonização de células hospedeiras, evasão da imunidade e desenvolvimento de biofilmes (RAMOS et al., 2018). Além disso, parece que a estrutura da parede celular de *Corynebacterium* spp., com diferentes tipos de ácidos corinemicólicos de cadeia longa, juntamente com a hidrofobicidade da parede celular podem desempenhar um papel importante na adesão bacteriana a superfícies inertes e disseminação de bactérias e promoção da formação de biofilme especialmente sob condições de desenvolvimento de infecção na presença de soro, e em condições limitantes de ferro (OLSON et al., 2002).

O modelo celular *in vitro* utilizando a linhagem celular HEP-2 tem sido empregado para investigar o potencial patogênico de várias espécies bacterianas, incluindo *E. coli* e *Corynebacterium* spp. (HIRATA JR et al., 2008; SPANO et al., 2017). Para *Corynebacterium* spp., como *C. pseudodiphtheriticum* e *C. diphtheriae*, o padrão de aderência agregativa (AA) às células HEP-2 tem sido correlacionado com o potencial invasivo e sobrevivência intracelular (HIRATA JR et al. 2008). Para outras *Corynebacterium* spp. não diftéricas, como *C. striatum*, a capacidade de aderir a superfícies abióticas e formar biofilmes é melhor compreendida (RAMOS et al., 2019). No entanto, para *C. amycolatum* e *B. ravensturnense*, os mecanismos de adesão a essas células humanas permanecem pouco compreendidos.

As cepas de *B. ravensturnense* e *C. amycolatum* avaliadas neste trabalho mostraram capacidade de aderir às células epiteliais humanas HEP-2 três horas após a infecção, apresentando um padrão AA, o que pode indicar um potencial invasivo dessas cepas. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos que permitem *B. ravensturnense* e *C. amycolatum* colonizarem e/ou infectarem indivíduos humanos.

Os mecanismos envolvidos na patogênese das infecções causadas por corineformes, tais como *Corynebacterium* spp. não diftéricas e *Brevibacterium* spp. são pouco conhecidos, mas a habilidade de aderir às superfícies bióticas e/ou abióticas juntamente com perfis MDR frequentes indicam seu potencial patogênico (CARVALHO et al., 2018; RAMOS et al., 2019).

As linhagens investigadas neste trabalho não só foram capazes de infectar e matar nematódeos, mas também induzir alterações morfológicas em *C. elegans*. Deformidade na região anal, eclosão interna de ovos, alterações morfológicas previamente descritas em *C. elegans* pela infecção por *C. striatum*, também foram induzidas pelas cepas avaliadas neste trabalho (SOUZA et al., 2019). Alguns dos vermes expostos às cepas MDR BR-SW-28 e BR-SW-32 desenvolveram estruturas semelhantes a cistos na região vulvar-útero (protrusão vulvar), um modo incomum de infecção no hospedeiro nematoide, sugerindo infecção do útero

por *C. amycolatum*, previamente evidenciado na infecção por *C. ulcerans* (SIMPSON-LOURÊDO et al., 2019).

Similarmente às cepas de *C. striatum* de Alibi e colaboradores (2021), nossas cepas mais virulentas apresentaram fenótipo MDR, o que pode sugerir associação entre genes de virulência com genes de resistência, entretanto são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

## CONCLUSÕES

- a) *C. amycolatum* tem sido cada vez mais relatado como agente etiológico de infecções hospitalares leves a graves, fato confirmado pelo presente estudo que mostrou uma taxa alarmante de cepas de *C. amycolatum* caracterizadas como uropatógenos de ITUs ambulatoriais com padrões MDR variáveis, enfatizando a disseminação mundial de espécies patogênicas MDR de *Corynebacterium* spp.;
- b) Os dados epidemiológicos do nosso trabalho confirmaram a maior vulnerabilidade das mulheres para aquisição de ITU (97,37%), predominantemente isoladas de adultos em idade ativa (63,16%), seguidos de idosos (28,95%), aparentemente imunocompetentes, uma vez que foram provenientes de atendimento ambulatorial;
- c) Algumas cepas com perfis MDR apresentaram o gene *bla* codificador de beta-lactamase classe A envolvida na resistência a penicilinas e cefalosporinas, reiterando a importância destes isolados não serem prontamente descartados como contaminantes mesmo quando encontrados associadas a uma ou mais cepas potencialmente patogênicas em uma amostra clínica de pacientes hospitalizados e ambulatoriais, independentemente da idade, sexo e comorbidades.
- d) No presente estudo, relatamos o isolamento de duas cepas MDR do grupo BGPI, *B. ravensturnense* e *C. amycolatum* em associação com uma cepa MDR de *E. coli* da urina de uma idosa com sinais e sintomas clínicos de ITU. Embora *C. amycolatum* tenha sido recuperado de amostras de urina humana e relacionado a diferentes tipos de infecções humanas, até onde se sabe, este é o primeiro relato de isolamento de *B. ravensturnense* de urina humana no Brasil. Esses dados reforçam a necessidade de uma maior atenção aos corineformes recuperados de espécimes clínicos provenientes dessa faixa etária tanto em pacientes ambulatoriais quanto hospitalares.
- e) As cepas de *B. ravensturnense* e *C. amycolatum* avaliadas neste trabalho mostraram capacidade de aderir às células epiteliais humanas HEp-2 três horas após a infecção, apresentando um padrão AA, o que pode indicar um potencial invasivo dessas cepas. Estudos adicionais são necessários para confirmar o potencial invasivo destes isolados, bem como para elucidar os mecanismos que permitem *C. amycolatum* e *B. ravensturnense* colonizarem e/ou infectarem indivíduos humanos.

f) Além de serem capazes de aderir especificamente às células epiteliais humanas, as cepas de *C. amycolatum* avaliadas neste trabalho levaram a morte dos nematódeos *C. elegans* seis dias após a infecção em diferentes níveis. Os maiores níveis de mortalidade de nematódeos foram observados pelas cepas *C. amycolatum* MDR BR-SW-27 (90%), BR-SW-28 (86%), BR-SW-14 (86%) e BR-SW-33 (84%). Todas as cepas de *C. amycolatum* testadas levaram a mais de 60% de mortalidade nos nematódeos infectados, e a sobrevivência média dos vermes (LT50s) variou entre 3 dias (BR-SW-28) e 5 dias (BR-SW-23 e BR-SW-43).

g) As linhagens de *C. amycolatum* investigadas neste trabalho não só foram capazes de infectar e matar nematódeos, mas também induzir alterações morfológicas em *C. elegans*. Todas as cepas foram capazes de induzir alterações morfológicas na região anal (fenótipo Dar) e eclosão interna de ovos (*bagging*) em *C. elegans*. Alguns dos vermes expostos às cepas MDR BR-SW-28 e BR-SW-32 desenvolveram estruturas semelhantes a cistos na região vulvar-útero (protrusão vulvar), um modo incomum de infecção no hospedeiro nematoide, sugerindo infecção do útero por *C. amycolatum*, previamente evidenciado na infecção por *C. ulcerans*. As cepas mais virulentas apresentaram perfis MDR, o que pode sugerir associação entre genes de virulência com genes de resistência, mas são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

h) Nosso trabalho demonstrou a importância da vigilância de cepas *C. amycolatum* MDR no ambiente ambulatorial, e os dados aqui relatados podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade de *C. amycolatum* e melhor manejo das infecções causadas por eles.

## REFERÊNCIAS

- ABALLAY, A.; YORGEY, P.; AUSUBEL, F. M. *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, v. 10, n. 23, p. 1539-1542, 2000.
- ABE, M. et al. Clinical characteristics and drug susceptibility patterns of *Corynebacterium* species in bacteremic patients with hematological disorders. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 40, n. 10, p. 2095-2104, 2021.
- ABU, S. et al. Urine Bacteriology in Post-Kidney Transplant Patients with Double-J Stents. *Ann. Health Res.*, v. 7, n. 4, p. 358-364, 2021.
- ADDERSON, E. E. et al. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, n. 3, p. 921-927, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (Brasil). Principais síndromes infecciosas. In: *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. 1ª ed. Brasília: Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- ALATOOM, A. A. et al. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 1, p. 160-163, 2012.
- ALFÖLDI, J.; LINDBLAD-TOH, K. Comparative genomics as a tool to understand evolution and disease. *Genome Res.*, v. 23, n. 7, p. 1063-1068, 2013.
- ALIBI, S. et al. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathol. Biol.*, v. 63, n. 4-5, p. 153-157, 2015.
- ALIBI, S. et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Sci. Rep.*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.
- ALIBI, S. et al. Virulence of clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces. *Microb. Pathog.*, v. 155, p. 104887, 2021.
- ALÓS, J. I. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 23, p. 3-8, 2005.
- ALVAREZ, M. et al. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated ampC  $\beta$ -lactamases in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 2, p. 533-537, 2004.

- ALVES, R. L. et al. Etiology, frequency and clinical outcomes related to Urinary Tract Infection and Asymptomatic Bacteriuria in pregnant women in a municipality of Southeast Brazil. *Res., Soc. Dev.*, v. 11, n. 3, p. e47611326650-e47611326650, 2022.
- AMBLER, R. P. The structure of  $\beta$ -lactamase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* v. 289, n. 36, p. 321-331, 1980.
- AMIRI, M. et al. Prevalence of urinary tract infection among pregnant women and its complications in their newborns during the birth in the hospitals of Dezful city, Iran, 2012-2013. *Iran. Red Crescent Med. J.*, v. 17, n. 8, 2015.
- ANDRADE, L. N. *Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de KPC no Brasil*. 2011. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnol.*, v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.
- ANTUNES, C. A. et al. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria. *Microbiol.*, v. 162, n. 1, p. 84-93, 2016.
- ANTUNES, C. A. et al. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiol.*, v. 161, n. 3, p. 639-647, 2015.
- AREND, L. N. V. S. *Caracterização molecular, fenotípica e epidemiológica de micro-organismos produtores de carbapenemase KPC isolados no Estado do Paraná*. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- ASAI, N. et al. *Brevibacterium paucivorans* bacteremia: case report and review of the literature. *BMC Infect. Dis.*, v. 19, n. 1, p. 1-5, 2019.
- AYUB, M. et al. *E. coli* the Most Prevalent Causative Agent Urinary Tract Infection in Pregnancy: Comparative Analysis of Susceptibility and Resistance Pattern of Antimicrobials. *Arch. Clin. Microbiol.*, v. 7, n. 4, p. 0-0, 2016.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updat.*, v. 9, n. 3, p. 142-156, 2006.
- BADELL, E. et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the *diphtheriae* species complex. *Res. Microbiol.* v. 171, n. 3-4, p. 122-127, 2020.
- BAGGE, N. et al. Rapid development in vitro and in vivo of resistance to ceftazidime in biofilm-growing *Pseudomonas aeruginosa* due to chromosomal  $\beta$ -lactamase. *APMIS*, v. 108, n. 9, p. 589-600, 2000.
- BAIO, P. V. P. et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 1, p. 23-29, 2013.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.*, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.

- BAL, Z. S. et al. The first reported catheter-related *Brevibacterium casei* bloodstream infection in a child with acute leukemia and review of the literature. *Braz. J. Infect. Dis.* v. 19, p. 213-215, 2015.
- BARBERIS, C. et al. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS One*, v. 9, n. 9, p. e106303, 2014.
- BAUERNFEIND, A.; SCHWEIGHART, S.; CHONG, Y. Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, v. 17, n. 5, p. 316-321, 1989.
- BECEIRO, A. et al. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.
- BEHZADI, P. et al. A survey on urinary tract infections associated with the three most common uropathogenic bacteria. *Maedica*, v. 5, n. 2, p. 111-115, 2010.
- BENSON JR, C. E.; TATEM, L. Successful Treatment of *Brevibacterium* Bacteremia Solely With Antimicrobial Therapy. *Cureus*, v. 13, n. 6, p. e16004, 2021.
- BENT, S. et al. Does this woman have an acute uncomplicated urinary tract infection? *JAMA*, v. 287, n. 20, p. 2701-2710, 2002.
- BERNARD, K. A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform like. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 10, 2012.
- BERNARD, K. A. et al. Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 63, n. Pt\_6, p. 2146-2154, 2013.
- BERNARD, K. A.; FUNKE, G. *Corynebacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria (Online)*. London: John Wiley & Sons, p. 1-70, 2015.
- BERNARD, K. A.; FUNKE, G. Genus I. *Corynebacterium*. In *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, v. 5, p. 245– 289. New York: Springer, 2012.
- BERTONA, E. et al. Un caso inusual de quiste sebáceo infectado por *Dermabacter hominis*. *Rev. Argent. Microbiol.*, v. 48, n. 4, p. 303-307, 2016.
- BILLE, E. et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 18, n. 11, p. 1117-1125, 2012.
- BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 208, n. 1, p. 41-45, 2002.
- BLAUWKAMP, T. A. et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nat. Microbiol.*, v. 4, n. 4, p. 663-674, 2019.

- BORDE, K. et al. Not always a commensal: A case of mastitis by *Corynebacterium amycolatum*. *IDCases*, v. 20, p. e00728, 2020.
- BOSCIA, J. A. et al. Lack of Association Between Bacteriuria and Symptoms in the Elderly. *J. Urol.*, v. 138, n. 3, p. 681-681, 1987.
- BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 64, n. 1, p. 29-63, 1995.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.
- BRIDIER, A. et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, v. 27, n. 9, p. 1017-1032, 2011.
- BROADWAY, M. M. et al. Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *J. Bacteriol.*, v. 195, n. 16, p. 3774-3783, 2013.
- BROLUND, A. et al. Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e65793, 2013.
- BROWN, J. S. et al. Urologic complications of diabetes. *Diabetes Care*, v. 28, n. 1, p. 177-185, 2005.
- BROWN, P. D. Urinary tract infections in renal transplant recipients. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, v. 4, n. 6, p. 525-528, 2002.
- BUELOW, E. et al. Effects of selective digestive decontamination (SDD) on the gut resistome. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 69, n. 8, p. 2215-2223, 2014.
- BURKOVSKI, A. Diphtheria and its etiological agents. In: *Corynebacterium diphtheriae and related toxigenic species*. Springer, Dordrecht, 2014. p. 1-14.
- BUSH, K. Metallo- $\beta$ -lactamases: A class apart. *Clin. Infect. Dis.*, v.27, suppl.1, p.48-S53, 1998.
- BUSH, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 1, n. 1, p. 109-123, 1988.
- BUSH, K. et al. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 37, n. 4, p. 851-858, 1993.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, n.6, p.1211-1233, 1995.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.



- BUTLER, C. C. et al. Incidence, severity, help seeking, and management of uncomplicated urinary tract infection: a population-based survey. *Br. J. Gen. Pract.*, v. 65, n. 639, p. e702-e707, 2015.
- CAMELLO, T. C. F. et al. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 34, p. 39-44, 2003.
- CAMELLO, T. C. F. *Corynebacterium spp. e outros micro-organismos corineformes de importância médica*. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- CAMPANILE, F. et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 15, n. 1, p. 75, 2009.
- CAMPO-URBINA, M. L. et al. Caracterización y perfil de susceptibilidad de uropatógenos asociados a la presencia de bacteriuria asintomática en gestantes del Departamento del Atlántico, Colombia, 2014-2015: Estudio de corte transversal. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.*, v. 68, n. 1, p. 62-70, 2017.
- CARBONNELLE, E. et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J. Microbiol. Methods*, v. 89, n. 2, p. 133-136, 2012.
- CARVALHO, R.V. et al. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *Braz. J. Infect. Dis.* v. 22, n. 4, p. 347–351, 2018.
- CAZANAVE, C. et al. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 5, p. 1518-1523, 2012.
- CERDEÑO-TARRAGA, A. M. et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic acids Res.*, v. 31, n. 22, p. 6516-6523, 2003.
- CHANT, C.; LEUNG, A.; FRIEDRICH, J. O. Optimal dosing of antibiotics in critically ill patients by using continuous/extended infusions: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Care*, v. 17, n. 6, p. 1-16, 2013.
- CHEN, Y. et al.  $\beta$ -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J. Bacteriol.*, v. 185, n. 3, p. 823-830, 2003.
- CHIU, C. Y.; MILLER, S. A. Clinical metagenomics. *Nat. Rev. Genet.*, v. 20, n. 6, p. 341-355, 2019.
- CHUANG, P.; PARIKH, C. R.; LANGONE, A. Urinary tract infections after renal transplantation: a retrospective review at two US transplant centers. *Clin. Transplant.*, v. 19, n. 2, p. 230-235, 2005.
- CHUGHTAI, B. et al. Benign prostatic hyperplasia. *Nat. Rev. Dis. Primers*, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2016.

CHUNG, C. S. et al. Percutaneous nephrostomy tube-associated bacteremia caused by *Corynebacterium urealyticum*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 41, n. 6, p. 525-527, 2008.

CLAEYS, K. C. et al. Advances and challenges in the diagnosis and treatment of urinary tract infections: the need for diagnostic stewardship. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, v. 21, n. 4, p. 1-9, 2019.

CLARK, L. C.; HODGKIN, J. Commensals, probiotics and pathogens in the *Caenorhabditis elegans* model. *Cell. Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 27-38, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*. CLSI guideline M45. 3 ed. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. CLSI supplement M100. 30 ed. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020.

COHEN, K. A. et al. Evolution of extensively drug-resistant tuberculosis over four decades: whole genome sequencing and dating analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS Med.*, v. 12, n. 9, p. e1001880, 2015.

COLLINS, L. Diagnosis and management of a urinary tract infection. *Br. J. Nurs.*, v. 28, n. 2, p. 84-88, 2019.

COLLINS, M. D.; BURTON, R. A.; JONES, D. *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 49, n. 3, p. 349-352, 1988.

COSSART, P.; JONQUIÈRES, R. Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 97, n. 10, p. 5013-5015, 2000.

COSTA, I. A. C. et al. Infecção do trato urinário causada por *Escherichia coli*: revisão de literatura. *Salusvita*, Bauru, v. 38, n. 1, p. 155-193, 2019.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COTRIM, E. R.; ROCHA, R. D. R.; FERREIRA, M. F. R. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–KPC em *Enterobacteriaceae*: o desafio das bactérias multirresistentes. *Revista do Centro Universitário Newton Paiva*, v. 5, n. 1, 2012

COYLE, M. B. et al. Erythromycin and clindamycin resistance in *Corynebacterium diphtheriae* from skin lesions. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 16, n. 4, p. 525-527, 1979.

CUNHA, M. A. et al. Antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in a northeastern Brazilian capital. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 58, 2016.

DALAL, A.; URBAN, C.; SEGAL-MAURER, S. Endocarditis due to *Corynebacterium amycolatum*. *J. Med. Microbiol.*, v. 57, n. 10, p. 1299-1302, 2008.

DANGEL, A. et al. *Corynebacterium silvaticum* sp. nov., a unique group of NTTB corynebacteria in wild boar and roe deer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 70, n. 6, p. 3614-3624, 2020.

DAUTT-LEYVA, J. G. et al. Maternal and perinatal complications in pregnant women with urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. *Obstet. Gynaecol. Res.*, v. 44, n. 8, p. 1384-1390, 2018.

DAYAN, N. et al. Urinary tract infections caused by community-acquired extended-spectrum beta-lactamase-producing and nonproducing bacteria: a comparative study. *J. Pediatr.* v. 163, n. 5, p. 1417-1421, 2013.

DAZAS, M. et al. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar *Belfanti* and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 68, n. 12, p. 3826-3831, 2018.

DE ROSE, R. et al. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 90, n. 1-2, p. 55-63, 2002.

DELAMAIRE, M. et al. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet. Med.*, v. 14, n. 1, p. 29-34, 1997.

DENG, Y. et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clinical Microbiol. Antimicrob.*, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2015.

DHARNIDHARKA, V. R.; STABLEIN, D. M.; HARMON, W. E. Post-Transplant Infections Now Exceed Acute Rejection as Cause for Hospitalization: A Report of the NAPRTCS1. *Am. J. Transplant.*, v. 4, n. 3, p. 384-389, 2004.

DIELUBANZA, E. J.; SCHAEFFER, A. J. Urinary tract infections in women. *Med. Clin.*, v. 95, n. 1, p. 27-41, 2011.

DJAHMI, N. et al. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res. Int.*, v. 2014, 2014.

DOBLER, G.; BRAVENY, I. Highly resistant *Corynebacterium macginleyi* as cause of intravenous catheter-related infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 22, n. 1, p. 72-73, 2002.

DORAN, K. S. et al. Host-pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropathol.*, v. 131, n. 2, p. 185-209, 2016.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.*, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

DORER, M. S.; ISBERG, Ralph R. Non-vertebrate hosts in the analysis of host–pathogen interactions. *Microbes Infect.*, v. 8, n. 6, p. 1637-1646, 2006.

DRAGOMIRESCU C. C. et al. Antimicrobial susceptibility testing for *Corynebacterium* species isolated from clinical samples in Romania. *Antibiotics*, v. 9, n. 1, p. 31, 2020.

DUARTE, G. et al. Infecção urinária na gravidez. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 30, n. 2, p. 93-100, 2008.

DUBOIS, D. et al. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 8, p. 2568-2576, 2012.

EADY, E. A. et al. Antibiotic resistance patterns of aerobic coryneforms and furazolidone-resistant Gram-positive cocci from the skin surface of the human axilla and fourth toe cleft. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 46, n. 2, p. 205-213, 2000.

EFSTRATIOU, A. et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 11, p. 3173-3177, 1998.

EFSTRATIOU, A.; MAPLE, P. A. C. Diphtheria: manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. *WHO*, 1994.

EIDENSOHN, Y. et al. Brevibacteria tibial osteomyelitis. *IDCases*, v. 23, p. e01046, 2021.

ELIOPOULOS, G. M.; BUSH, K. New  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.*, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

ENGLER, K. H. et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 1, p. 80-83, 2002.

ENGLER, K. H.; EFSTRATIOU, A. Rapid enzyme immunoassay for determination of toxigenicity among clinical isolates of *corynebacteria*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 4, p. 1385-1389, 2000.

ERIKSEN, B. C. A randomized, open, parallel-group study on the preventive effect of an estradiol-releasing vaginal ring (Estring) on recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 180, n. 5, p. 1072-1079, 1999.

EVANS, E. A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog.*, v. 4, n. 10, p. e1000175, 2008.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; MAIBACH, H. I. *Textbook of aging skin*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2009.

FARAJNIA, S. et al. Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 13, n. 2, p. 140-144, 2009.

FARFOUR, E. et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 8, p. 2702-2707, 2012.

FERNÁNDEZ-NATAL, M.I. et al. The isolation of *Corynebacterium coyleae* from clinical samples: clinical and microbiological data. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 27, n. 3, p. 177-184, 2008.

FERNANDEZ-ROBLAS, R. et al. In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 33, n. 5, p. 453-455, 2009.

FIGUEIRAL, A. C. D.; FARIA, M. G. I. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: um problema sem solução. *Braz. J. Surg. Clin. Res.*, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2015.

FIGUEIREDO, A.; GOMES, G.; CAMPOS, A. Infecções Urinárias e Gravidez-Diagnóstico, Terapêutica e Prevenção. *Acta Obstet. Ginecol. Port.*, p. 124-133, 2012.

FINUCANE, T. E. “Urinary tract infection”—requiem for a heavyweight. *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 65, n. 8, p. 1650-1655, 2017.

FISHMAN, J. A. Infection in organ transplantation. *Am. J. Transplant.*, v. 17, n. 4, p. 856-879, 2017.

FLEMMING, H. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 14, n. 9, p. 563, 2016.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

FLORES-MIRELES, A.; HREHA, T. N.; HUNSTAD, D. A. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Top Spinal Cord Inj Rehabil*, v. 25, n. 3, p. 228-240, 2019.

FORLAND, M.; THOMAS, V. L. The treatment of urinary tract infections in women with diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 8, n. 5, p. 499-506, 1985.

FORSLUND, K. et al. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Gen. Res.*, v. 23, n. 7, p. 1163-1169, 2013.

FORWARD, K. R. et al. Molecular mechanisms of cefoxitin resistance in *Escherichia coli* from the Toronto area hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 41, n. 1-2, p. 57-63, 2001.

FOSTER SR, R. T. Uncomplicated urinary tract infections in women. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, v. 35, n. 2, p. 235-248, 2008.

- FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.*, v. 113, n. 1, p. 5-13, 2002.
- FOXMAN, B. et al. First-time urinary tract infection and sexual behavior. *Epidemiol.*, v. 6, n. 2, p. 162-168, 1995.
- FOXMAN, B. et al. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann. Epidemiol.*, v. 10, n. 8, p. 509-515, 2000.
- FREITAS, F. et al. Long-term dissemination of acquired ampC  $\beta$ -lactamases among *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in Portuguese clinical settings. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 33, n. 4, p. 551-558, 2014.
- FROLOVA, Y.N.; KHARSEYEVA, G. G.; MIRONOV, A. Y. The sensitivity to antibiotics of biofilm cultures of toxigenic strains *Corynebacterium diphtheriae*. *Klin. Lab. Diagn.*, n. 6, p. 51-53, 2014.
- FUCK, V. M. S. *Infecção do trato urinário: novo protocolo clínico de atendimento às crianças em emergência pediátrica*. Brasília, 2009. 58f. Monografia (Especialização em Pediatria) – Hospital Regional da Asa Sul – Programa de Residência Médica em Pediatria, Brasília, 2009.
- FÜNFBSTÜCK, R. et al. Urinary tract infection in patients with diabetes *mellitus*. *Clin. Nephrol.*, v. 77, n. 1, p. 40, 2012.
- FUNKE, G. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 10, n. 1, p. 125-159, 1997.
- FUNKE, G.; BERNARD, K. A. Coryneform gram-positive rods. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 9 ed. Washington, D.C: ASM Press. 2007. p. 485–514.
- \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 10 ed. Washington, D.C: ASM Press. 2011. p. 413-471.
- FUNKE, G.; PETERS, K.; ARAVENA-ROMAN, M. Evaluation of the RapID CB Plus system for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 9, p. 2439-2442, 1998.
- FURUYA, E. Y.; LOWY, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 4, n. 1, p. 36-45, 2006.
- FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.*, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.
- GAJDÁCS, M. et al. Increasing relevance of Gram-positive *cocci* in urinary tract infections: a 10-year analysis of their prevalence and resistance trends. *Sci. Rep.*, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- GALES, A. C. et al. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 38, n. 1, p. 13-20, 2002.

- GARCIA, R.; SPITZER, E. D. Promoting appropriate urine culture management to improve health care outcomes and the accuracy of catheter-associated urinary tract infections. *Am. J. Infect. Control*, v. 45, n. 10, p. 1143-1153, 2017.
- GARSIN, D. A. et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, n. 19, p. 10892-10897, 2001.
- GASPAR, A. H.; TON-THAT, H. Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.*, v. 188, n. 4, p. 1526-1533, 2006.
- GEERLINGS, S. E. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. *Microbiol. Spectr.*, v. 4, n. 5, p. 4.5. 03, 2016.
- GEERLINGS, S. E. et al. Asymptomatic bacteriuria can be considered a diabetic complication in women with diabetes mellitus. In: *Genes and Proteins Underlying Microbial Urinary Tract Virulence*. Springer, Boston, MA, 2002. p. 309-314.
- GEERLINGS, S. E. et al. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 30, n. 11, p. 995-1001, 2000.
- GHERARDI, G. et al. *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract infection: Case report and review of the literature. *IDCases.*, v. 2, n. 2. p. 56-58, 2015.
- GIBSON, A. K. et al. The evolution of parasite host range in heterogeneous host populations. *J. Evol. Biol.*, 2020.
- GILBERT, L. Infections with *Corynebacterium diphtheriae*--changing epidemiology and clinical manifestations. Report of the third international meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD), Institute Pasteur, Paris 7-8 June 1996. *Commun. Dis. Intell.*, v. 21, n. 12, p. 161-164, 1997.
- GLASER, A. P.; SCHAEFFER, A. J. Urinary tract infection and bacteriuria in pregnancy. *Urol. Clin. N. Am.*, v. 42, n. 4, p. 547-560, 2015.
- GOLDNER, N. K. et al. Mechanism of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum*. *Msphere*, v. 3, n. 4, p. e00371-18, 2018.
- GOMES, D. L. R. *Participação de carboidratos de superfície de amostras de Corynebacterium diphtheriae na hemaglutinação*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- GOMES, D. L. R. et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J. Med. Microbiol.*, v. 58, n. 11, p. 1419-1427, 2009.
- GOMES, D. L. R. et al. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J. Med. Microbiol.*, v. 62, n. 5, p. 754-760, 2013.

GOMES, S. W. C. et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Uropathogens Isolated from Ambulatorial and Nosocomial Infections at Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. epidemiol. Controle Infecç.*, v. 7, n. 1, p. 52-56, 2017.

GONEAU, L. W. et al. Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 58, n. 4, p. 2089-2097, 2014.

GONEAU, L. W. et al. Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *MBio*, v. 6, n. 2, p. e00356-15, 2015.

GUGLIETTA, A. Recurrent urinary tract infections in women: risk factors, etiology, pathogenesis and prophylaxis. *Future Microbiol.*, v. 12, n. 3, p. 239-246, 2017.

GUIRAO, G. Y. et al. Implicación de los genes *ermX* en la resistencia a los macrólidos y la telitromicina de *Corynebacterium jeikeium* y *Corynebacterium amycolatum*. *Rev. Española Quimioter.*, v. 18, p. 236-242, 2005.

GUPTA, K.; GRIGORYAN, L.; TRAUTNER, B. Urinary tract infection. *Ann. Intern. Med.*, v. 167, n. 7, p. ITC49-ITC64, 2017.

GYFTOPOULOS, K. et al. Clinical implications of the anatomical position of the urethra meatus in women with recurrent post-coital cystitis: a case-control study. *Int. Urogynecol. J.*, v. 30, n. 8, p. 1351-1357, 2019.

HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, v. 12, n. 6, p. 1439-1449, 1975.

HARRIS, P. N. A.; TAMBYAH, P. A.; PATERSON, D. L.  $\beta$ -lactam and  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? *Lancet Infect. Dis.*, v. 15, n. 4, p. 475-485, 2015.

HAUSER, D. et al. Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains: correlation with ADP-ribosylation activity assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 10, p. 2720-2723, 1993.

HEILBERG, I.P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário-ITU. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 49, n. 1, p. 109-116, 2003.

HENNART, M. et al. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. *Genome Med.*, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2020.

HERNANDO-ORTIZ, A. et al. *Caenorhabditis elegans* as a model system to assess *Candida glabrata*, *Candida nivariensis*, and *Candida bracarensis* Virulence and Antifungal Efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 64, n. 10, p. e00824-20, 2020.



- HILT, E. E. et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J. Clin. Microbiol.*, v. 52, n. 3, p. 871-876, 2014.
- HIRATA JR, R. et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 41, p. 986-991, 2008.
- HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 65, n. 6, p. 1119-1125, 2010.
- HODGKIN, J. et al. Two *Leucobacter* strains exert complementary virulence on *Caenorhabditis* including death by worm-star formation. *Curr. Biol.*, v. 23, n. 21, p. 2157-2161, 2013.
- HODGSON, A. L. et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 7, p. 2900-2905, 1992.
- HOEPELMAN, A. I. M. Pathogenesis and management of bacterial urinary tract infections in adult patients with diabetes mellitus. In: *The Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus*, 1 ed. CRC Press, p. 245-262, 2004.
- HOLMES, R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *J. Infect. Dis.*, v. 181, n. Supplement\_1, p. S156-S167, 2000.
- HOOTON, T. M. et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, v. 50, n. 5, p. 625-663, 2010.
- HOPE, I. A. Background on *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans: A practical approach*, Oxford University Press, p. 1-15, 1999.
- HOSKING, D. J.; BENNETT, T.; HAMPTON, J. R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, v. 27, n. 10, p. 1043-1054, 1978.
- HU, Y. et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat. Commun.*, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2013.
- HUMMELL, N. A.; KIRIENKO, N. V. Repurposing bioactive compounds for treating multidrug-resistant pathogens. *J. Med. Microbiol.*, v. 69, n. 9, p. 881-894, 2020.
- IJAZ, M. et al. Urinary tract infection in diabetic patients; causative bacteria and antibiotic sensitivity. *J. Med. Sci.*, v. 22, n. 3, p. 110-114, 2014.
- INNS, T. et al. Service evaluation of selected risk factors for extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* urinary tract infections: a case-control study. *J. Hosp. Infect.*, v. 88, n. 2, p. 116-119, 2014.

- JACOBSEN, S. M. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 21, n. 1, p. 26-59, 2008.
- JACOBY, G. A. ampC  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.
- JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new  $\beta$ -lactamases. *N. Engl. J. Med.*, v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.
- JÁCOME, P. R. L. A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 56, n. 9, p. 4990-4990, 2012.
- JAIN, C. et al. A pathogenesis assay using *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* reveals novel roles for yeast AP-1, Yap1, and host dual oxidase BLI-3 in fungal pathogenesis. *Eukaryot. Cell*, v. 8, n. 8, p. 1218-1227, 2009.
- JANDA, W. M. *Corynebacterium* Species and the Coryneform Bacteria: Part I: New and Emerging Species in the Genus *Corynebacterium*. *Clin. Microbiol. Newsl.*, v. 20, n. 6, p. 41-52, 1998.
- JAÉN-LUCHORO, D. et al. *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and environmental associated corynebacterium. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 126039, 2020.
- JO, K. J. et al. Non-carbapenem antimicrobial therapy in young infant with urinary tract infections caused by community-acquired extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Pediatr. Neonatol.*, v. 62, n. 3, p. 271-277, 2021.
- JOHN, A. S.; MBOTO, C. I.; AGBO, B. A review on the prevalence and predisposing factors responsible for urinary tract infection among adults. *Euro J. Exp. Bio.*, v. 6, n. 4, p. 7-11, 2016.
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Acute pyelonephritis in adults. *N. Engl. J. Med.*, v. 378, n. 1, p. 48-59, 2018.
- KAKOULLIS, L. et al. Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics*, v. 10, n. 4, p. 415, 2021.
- KALINDERI, K. et al. Urinary tract infection during pregnancy: current concepts on a common multifaceted problem. *J. Obstet. Gynaecol.*, v. 38, n. 4, p. 448-453, 2018.
- KANG, S. J. et al. Factors affecting the clinical relevance of *Corynebacterium striatum* isolated from blood cultures. *PLoS One*, v. 13, n. 6, p. e0199454, 2018.
- KASS, E. H. Asymptomatic infections of the urinary tract. *J. Urol.*, v. 167, n. 2, p. 1016-1020, 2002.
- KAUFFMAN, C. A. Diagnosis and management of fungal urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin.*, v. 28, n. 1, p. 61-74, 2014.

KAUR, T et al. Efficacy of Intravaginal Estrogen (Estriol) in Medical Management of Genitourinary Syndrome of Menopause in an Indian Asian Female. *Obstet. Gynaecol. Res.*, v. 4, n. 1, p. 34-42, 2021.

KAZMIERCZAK, A. et al. Differences between clavulanic acid and sulbactam in induction and inhibition of cephalosporinases in enterobacteria. *J. Int. Med. Res.*, v. 18, p. 67D-77D, 1990.

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 69, n. 4, p. 527-543, 2005.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 4, p. 1934-1936, 2005.

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

KLINE, K. A. et al. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe*, v. 5, n. 6, p. 580-592, 2009.

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

KNIGHTS, D. et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat. Method.*, v. 8, n. 9, p. 761-763, 2011.

KNOX, K. L.; HOLMES, A. H. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 8, n. 1, p. 97-99, 2002.

KOFTERIDIS, D. P. et al. Effect of diabetes *mellitus* on the clinical and microbiological features of hospitalized elderly patients with acute pyelonephritis. *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 57, n. 11, p. 2125-2128, 2009.

KONEMAN, E. W. et al. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*, 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008, 1488 p.

KONO, M.; SASATSU, M.; AOKI, T. R plasmids in *Corynebacterium xerosis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 23, n. 3, p. 506-508, 1983.

KOSTAKIOTI, M. et al. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, v. 3, n. 4, p. a010306, 2013.

KRIČKOVIĆ, Z. et al. Frequency of common complications during treatment of patients with benign prostate hyperplasia. *Scr. Med.*, v. 51, n. 1, p. 48-53, 2020.

- KRÖMER, J. O. et al. Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor McbR. *Microbiol.*, v. 154, n. 12, p. 3917-3930, 2008.
- KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. Infection in a dish: high-throughput analyses of bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 10, n. 1, p. 10-16, 2007.
- KWASZEWSKA, A. K. et al. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. *Pol. J. Microbiol.*, v. 55, n. 3, p. 189-193, 2006.
- LABROUSSE, A. et al. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr. Biol.*, v. 10, n. 23, p. 1543-1545, 2000.
- LACERDA, W. C. et al. Infecção urinária em mulheres: revisão da literatura. *Saúde em Foco*, v. 7, n. 1, p. 282-295, 2015.
- LAGROU, K. et al. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 30, n. 1, p. 7-15, 1998.
- LANGFORD, B. J. et al. The benefits and harms of antibiotic prophylaxis for urinary tract infection in older adults. *Clin. Infect. Dis.*, v. 73, n. 3, p. e782-e791, 2021.
- LAU, S. K. et al. Evidence for *Elizabethkingia anophelis* transmission from mother to infant, Hong Kong. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 21, n. 2, p. 232, 2015.
- LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infect. Dis.*, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.
- LEAL, S. M. et al. Clinical significance of commensal gram-positive rods routinely isolated from patient samples. *J. Clin. Microbiol.*, v. 54, n. 12, p. 2928-2936, 2016.
- LEE, S. H. et al. Prevalence and management status of urologic diseases in geriatric hospitals in South Korea: A field research. *Investig. Clin. Urol.*, v. 58, n. 1, p. 70-76, 2017.
- LETEK, M. et al. Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential *divIVA* gene as a target. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 265, n. 2, p. 256-263, 2006.
- LEYTON, B. et al. Treat me well or will resist: uptake of mobile genetic elements determine the resistome of *Corynebacterium striatum*. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 22, n. 14, p. 7499, 2021.
- LINHARES, I. et al. Incidence and diversity of antimicrobial multidrug resistance profiles of uropathogenic bacteria. *Biomed. Res. Int.*, v. 2015, p. 354084-354084, 2015.
- LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

- LODGE, J. M. et al. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase. *Biochem. J.*, v. 272, n. 3, p. 627, 1990.
- LOMAN, N. J. et al. A culture-independent sequence-based metagenomics approach to the investigation of an outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O104: H4. *JAMA*, v. 309, n. 14, p. 1502-1510, 2013.
- LOPES, R.M.; TAJRA, L.C.F. *Urgências em urologia*. 1 ed. São Paulo: ROCCA, 2008. 180 p.
- MAGES, I. S. et al. Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-like bacteria encountered in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, n. 9, p. 2980-2986, 2008.
- MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MAHONY, M. et al. Multidrug-resistant organisms in urinary tract infections in children. *Pediatr. Nephrol.*, v. 35, n. 9, p. 1563-1573, 2020.
- MANCINI, F. et al. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 73, n. 2, p. 111-120, 2012.
- 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.
- MANZELLA, J. P., KELLOGG, J. A.; PARSEY, K. S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. *Clin. Infect. Dis.*, v. 20, n. 1, p. 37-40, 1995.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* v. 32, p. 4-9, 2014.
- MARTINS, C. A. S. et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v. 104, n. 6, p. 905–913, 2009.
- MARTINY, D. et al. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 4, p. 1313-1325, 2012.
- MARULL, J.; CASARES, P.A. Nosocomial valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: a case report. *Cases J.*, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2008.
- MASSON, L. C. et al. Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o EAS. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v. 52, n. 1, p. 77-81, 2020.
- MATTOS-GUARALDI, A. L et al. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 170, p. 159-166, 1999.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Hemagglutination pattern of *Corynebacterium diphtheriae*. *Rev. Microbiol.*, v. 23, p. 8-12, 1992.

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

MEDINA, M.; CASTILLO-PINO, E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Ther. Adv. Urol.*, v. 11, p. 1756287219832172, 2019.

MILLER, R. R. et al. Metagenomics for pathogen detection in public health. *Genome Med.*, v. 5, n. 9, p. 1-14, 2013.

MILLER, S. et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid. *Genome Res.*, v. 29, n. 5, p. 831-842, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7 ed. Brasília, DF, 2009.

MIR, D. A.; BALAMURUGAN, K. In vitro and in vivo efficacy of *Caenorhabditis elegans* recombinant antimicrobial protein against Gram-negative bacteria. *Biofouling*, v. 35, n. 8, p. 900-921, 2019.

MIRANDA, E. J. P. et al. Susceptibility to antibiotics in urinary tract infections in a secondary care setting from 2005-2006 and 2010-2011, in São Paulo, Brazil: data from 11,943 urine cultures. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 56, p. 313-324, 2014.

MITCHELL, K. F. et al. Evaluating the Rapid Emergence of Daptomycin Resistance in *Corynebacterium*: a Multicenter Study. *J. Clin. Microbiol.*, v. 59, n. 4, p. e02052-20, 2021.

MNIF, M. F. et al. Complicated urinary tract infections associated with diabetes *mellitus*: Pathogenesis, diagnosis and management. *Indian J. Endocrinol. Metab.*, v. 17, n. 3, p. 442, 2013.

MOBLEY, D.; FEIBUS, A.; BAUM, N. Benign prostatic hyperplasia and urinary symptoms: evaluation and treatment. *Postgrad. Med.*, v. 127, n. 3, p. 301-307, 2015.

MONNAIE, D.; FRERE, J. M. Interaction of clavulanate with class C  $\beta$ -lactamases. *FEBS Lett.*, v. 334, n. 3, p. 269-271, 1993.

MONTELONGO HERNANDEZ, C.; PUTONTI, C.; WOLFE, A. J. Characterizing Plasmids in Bacteria Species Relevant to Urinary Health. *Microbiol. Spectr.*, v. 9, n. 3, p. e00942-21, 2021.

MOOSAVIAN, M.; RAHIMZADEH, M. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes, blaIMP-1, blaVIM-2 and blaSPM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran. *Iran. J. Microbiol.*, v. 7, n. 1, p. 2, 2015.

MOREIRA, L. O.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; ANDRADE, A. F. B. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of

*Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. *Arch Microbiol.*, v. 190, n. 5, p. 521-530, 2008.

MORRIS, A.; GUILD, I. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains. *Rev. Infect. Dis.*, v. 13, n. 5, p. 887-892, 1991.

MOSSER, T.; MATIC, I.; LEROY, M. Bacterium-induced internal egg hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, n. 22, p. 8189-8192, 2011.

MOTHERSHED, E. A. et al. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 12, p. 4713-4719, 2002.

MOURA, A. et al. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*, v. 25, n. 8, p. 1096-1098, 2009.

MOURA-COSTA, L. F. et al. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 126, n. 1-2, p. 131-141, 2008.

MOUTON, C. P. et al. Common infections in older adults. *Am. Fam. Physician*, v. 63, n. 2, p. 257-268, 2001.

MULVEY, M. R. et al. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, n. 1, p. 358-365, 2005.

MUNIAN, M. A. et al. *Corynebacterium jeikeium* osteomyelitis successfully treated with teicoplanin. *J. Infect.*, v. 35, n. 3, p. 325-326, 1997.

MUNSON, E.; CARROLL, K. C. Summary of novel bacterial isolates derived from human clinical specimens and nomenclature revisions published in 2018 and 2019. *J. Clin Microb.*, v. 59, n. 2, p. e01309-20, 2021.

MURRAY, P. R. et al. *Microbiologia médica*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase blaKPC gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008.

NAGATA, T. et al. Effect of erythromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 6, p. 2251-2259, 2004.

NATARAJAN, O. et al. The Immunomodulatory Effects of Royal Jelly on Defending Against Bacterial Infections in the *Caenorhabditis elegans* Model. *J. Med. Food*, 2020.

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

NEŠVERA, J.; HOCHMANNOVÁ, J.; PÁTEK, M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 169, n. 2, p. 391-395, 1998.

NICOLLE, L. E. Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis. *Urol. Clin. North Am.*, v. 35, n. 1, p. 1-12, 2008.

NICOLLE, L. E. Urinary tract infection. *Crit. Care Clin.*, v. 29, n. 3, p. 699-715, 2013.

NITZAN, O. et al. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes *mellitus*: review of prevalence, diagnosis, and management. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, v. 8, p. 129, 2015.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.*, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

NUDEL, K. et al. Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen of immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 24, n. 9, p. 1016. e7-1016. e13, 2018.

O'BRIEN, V. P. et al. A mucosal imprint left by prior *Escherichia coli* bladder infection sensitizes to recurrent disease. *Nat. Microbiol.*, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2016.

O'CALLAGHAN, D.; VERGUNST, A. Non-mammalian animal models to study infectious disease: worms or fly fishing?. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 13, n. 1, p. 79-85, 2010.

OCHI, F. et al. Catheter-Related Bloodstream Infection by *Brevibacterium casei* in a Child with Acute Myeloid Leukemia: Case Report and Literature Review. *Case Rep. Pediatr.*, v. 2021, 2021.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. v. 405, p. 405, 299–304, 2000.

OLENDER, A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Corynebacterium* spp. causing infections in people. In: *Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium*, Croatia: InTech v. 15, p. 387-402, 2012.

OLENDER, A. et al. A novel approach to study the effect of ciprofloxacin on biofilms of *Corynebacterium* spp. using confocal laser scanning microscopy. *Pol. J. Microbiol.*, v. 67, n. 4, p. 431, 2018

OLENDER, A. et al. Draft whole-genome sequence of *Brevibacterium casei* strain isolated from a bloodstream infection. *Braz. J. Microbiol.*, v. 51, n. 2, p. 685-689, 2020.

OLENDER, A.; NIEMCEWICZ, M. Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin B–Constitutive-Type Resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Isolated from Upper Respiratory Tract Specimens. *Microb. Drug Resist.*, v. 16, n. 2, p. 119-122, 2010.



- OLIVER, A. et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat.*, v. 21, p. 41-59, 2015.
- OLIVEIRA, A. et al. Insight of genus *Corynebacterium*: ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Front. Microbiol.*, v. 8, p. 1937, 2017.
- OLIVEIRA SILVA, M. T. et al. NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine*, v. 38, n. 51, p. 8099-8106, 2020.
- OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, n. 2, p. 86, 2002.
- ORDÓÑEZ-PALAU, S.; BOQUET, D. Chronic osteomyelitis of the metatarsal sesamoid due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, v. 74, n. 5, p. 509-517, 2007.
- ORREGO-MARIN, C. P.; HENAO-MEJIA, C. P.; CARDONA-ARIAS, J. A. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Med. Colomb.*, v. 39, n. 4, p. 352-358, 2014.
- ORTEGA-RIVEROS, M. et al. Usefulness of the non-conventional *Caenorhabditis elegans* model to assess *Candida* virulence. *Mycopathologia*, v. 182, n. 9-10, p. 785-795, 2017.
- OTEO, J. et al. Rates of faecal colonization by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among patients admitted to ICUs in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 70, n. 10, p. 2916-2918, 2015.
- OTT, L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS Microbiol.*, v. 4, n. 1, p. 85, 2018.
- OTT, L. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiol.*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2010.
- OTT, L. et al. Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 65, n. 3, p. 413-421, 2012.
- PACHECO, L. G. C. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.*, v. 56, n. 4, p. 480-486, 2007.
- PALLEN, M. J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.*, v. 44, n. 12, p. 1025-1026, 1991.
- PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant *enterococci* in critically ill patients. *Infection*, v. 42, n. 6, p. 1013-1022, 2014.

- PAPAVENTSIS, D. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 23, n. 2, p. 61-68, 2017.
- PARGAVI, B. et al. Prevalence of urinary tract infection (UTI) among diabetics patients in Vandavasi, Tamil Nadu, India. *Int. J. Biol. Technol.*, v. 2, n. 2, p. 42-45, 2011.
- PARTE, A. C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 70, n. 11, p. 5607, 2020.
- PATEL, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 437, p. 41-47, 2005.
- PAVIA, A. T. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 52, n. suppl\_4, p. S284-S289, 2011.
- PAYNE, D. J. et al. Rapid identification of metallo- and serine beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, n. 5, p. 991-996, 1994.
- PEARCE, M. M. et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio*, v. 5, n. 4, p. e01283-14, 2014.
- PEIXOTO, R. S. et al. Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of osteomyelitis. *J. Med. Microbiol.*, v. 65, n. 11, p. 1311-1321, 2016.
- PÉPIN, M.; BOISRAMÉ, A.; MARLY, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. In: *Ann. Rech. Vet.*, v. 20, n. 1, p. 111-115, 1989.
- PÉREZ-COBAS, A. E. et al. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e80201, 2013.
- PERROTTA C. et al. Estrógenos para prevenir la infección urinaria recurrente en mujeres postmenopáusicas (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, n. 2. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 30, p. 67-78, 2016.
- PIMENTA, F. P. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *J. Med. Microbiol.*, v. 57, n. 11, p. 1438-1439, 2008.
- PINTO, A. C. et al. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2014.
- PIRES, M. C. S. et al. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 40, p. 643-647, 2007.

- PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 715-727, 2006.
- POIREL, L. et al. Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene *blaSPM-1*-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 4, p. 1406-1409, 2004.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Acquired Carbapenem hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v. 3, p. 117-127, 2002.
- POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob Chemother.* v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.
- POTTER, R. F.; BURNHAM, C.-A. D.; DANTAS, G. In silico analysis of *Gardnerella* Genomespecies detected in the setting of bacterial vaginosis. *Clin. Chem.*, v. 65, n. 11, p. 1375-1387, 2019.
- PRABHAKAR, P. K. Pathophysiology of secondary complications of diabetes *mellitus*. *Pathophysiology*, v. 9, n. 1, 2016.
- PRETE, D. D. et al. Encrusted cystitis by *Corynebacterium urealyticum*: a case report with novel insights into bladder lesions. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 23, n.8, p. 2685-2687, 2008.
- QIN, L. et al. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures from hospitalized patients in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, p. JJID. 2015.530, 2017.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.
- RAMOS, J. N. et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect. Dis.* v. 19, n. 1. p. 1-11, 2019.
- RAMOS, J. N. et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 9, p. e180051, 2018.
- RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 41, n. 2, p. 223-232, 1997.
- RASMUSSEN, M.; MOHLIN, A. W.; NILSON, B. From contamination to infective endocarditis—a population-based retrospective study of *Corynebacterium* isolated from blood cultures. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 39, n. 1, p. 113-119, 2020.
- RAZ, R. et al. Effectiveness of estriol-containing vaginal pessaries and nitrofurantoin macrocrystal therapy in the prevention of recurrent urinary tract infection in postmenopausal women. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, n. 11, p. 1362-1368, 2003.
- RAZ, R.; STAMM, W. E. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N. Engl. J. Med.*, v. 329, n. 11, p. 753-756, 1993.

- RENARD, J. et al. Recurrent lower urinary tract infections have a detrimental effect on patient quality of life: a prospective, observational study. *Infect. Dis. Ther.*, v. 4, n. 1, p. 125-135, 2015.
- RENAUD, F. N. et al. Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 12, p. 3698-3702, 1998.
- RENKO, M. et al. Meta-analysis of the significance of asymptomatic bacteriuria in diabetes. *Diabetes care*, v. 34, n. 1, p. 230-235, 2011.
- RENOM, F. et al. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, n. 6, p. 2064–2067, 2007.
- REULAND, E. A. et al. Detection and occurrence of plasmid-mediated ampC in highly resistant gram-negative rods. *PLoS One*, v. 9, n. 3, p. e91396, 2014.
- ROBERT, K.; ANNA, S. G.; GRAŻYNA, M. *Corynebacterium* Species Causing Urinary Tract Infections. *Microbiol Res J Int*, v. 24, p. 1-9, 2018.
- ROBLEDO, I. E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010.
- ROCHA, D. J. P. et al. Whole-genome sequencing reveals misidentification of a multidrug-resistant urine clinical isolate as *Corynebacterium urealyticum*. *J. Global Antimicrob. Resist.*, v. 23, p. 16-19, 2020.
- RORIZ-FILHO, J. S. et al. Infecção do trato urinário. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 43, n. 2, p. 118-25, 2010.
- ROSATO, A. E.; LEE, B. S.; NASH, K.A. Inducible macrolide resistance in *Corynebacterium jeikeium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 7, p. 1982-1989, 2001.
- ROSEN, G. L.; REICHENBERGER, E. R.; ROSENFELD, A. M. NBC: the Naive Bayes Classification tool webserver for taxonomic classification of metagenomic reads. *Bioinformatics*, v. 27, n. 1, p. 127-129, 2011.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.
- ROSSOLINI, G. M. Acquired metallo- $\beta$ -lactamases: an increasing clinical threat. *Clin. Infect. Dis.*, v. 41, n. 11, p. 1557-1558, 2005.
- RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.
- SANTIAGO, G. R. et al. Urinary tract infection leading to hospital admission during the first year after kidney transplantation: A retrospective cohort study. *Transplant. Rep.*; v. 1, n. 3-4, p. 18-22, 2016.

SANTOS, A. L. et al. Profile of enterobacteria resistant to beta-lactams. *Antibiotics*, v. 9, n. 7, p. 410, 2020.

SANTOS, L. S. et al. Tellurite resistance: a putative pitfall in *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? *Antonie Leeuwenhoek*, v. 108, n. 5, p. 1275-1279, 2015.

SARMA, A. V.; WEI, J. T. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. *N. Engl. J. Med.*, v. 367, n. 3, p. 248-257, 2012.

SCHECHNER, V. et al. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: who is prone to become clinically infected? *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 19, n. 5, p. 451-456, 2013.

SCHNEEBERGER, C.; KAZEMIER, B. M.; GEERLINGS, S. E. Asymptomatic bacteriuria and urinary tract infections in special patient groups: women with diabetes *mellitus* and pregnant women. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 27, n. 1, p. 108-114, 2014.

SCHRÖDER, 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. 1, p. 1-19, 2012.

SCHUHEGGER, R. et al. Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, n. 8, p. 2822-2823, 2008.

SCHULTHESS, B. et al. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, v. 52, n. 4, p. 1089-1097, 2014.

SENGUPTA, M. et al. *Corynebacterium amycolatum*: an unexpected pathogen in the ear. *J. Clin. Diagn. Res.*, v. 9, n. 12, p. DD01, 2015.

SEWIFY, M. et al. Prevalence of urinary tract infection and antimicrobial susceptibility among diabetic patients with controlled and uncontrolled glycemia in Kuwait. *J. Diabetes Res.*, v. 2016, 2016.

SHAH, B. R.; HUX, J. E. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes care*, v. 26, n. 2, p. 510-513, 2003.

SHAH, M. A. et al. Prevalence and associated factors of urinary tract infections among diabetic patients. *Health Sci. J.*, v. 13, n. 2, p. 1-5, 2019.

SHALLCROSS, L. et al. Antibiotic prescribing for lower UTI in elderly patients in primary care and risk of bloodstream infection: a cohort study using electronic health records in England. *PLoS Med.*, v. 17, n. 9, p. e1003336, 2020.

SHEU, S. Y. et al. Cloning, expression, and deletion analysis of large nanH of *Clostridium perfringens* ATCC 10543. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 31, n. 6, p. 794-803, 2002.

SIDJABAT, H. E. et al. Expansive spread of IncI1 plasmids carrying bla<sub>CMY-2</sub> amongst *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 44, n. 3, p. 203-208, 2014.

SIFRI, C. D.; BEGUN, J.; AUSUBEL, F. M. The worm has turned—microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol.*, v. 13, n. 3, p. 119-127, 2005.

SILVEIRA, S. A. et al. Prevalência e suscetibilidade bacteriana em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Uberaba. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v. 42, n. 3, p. 157-160, 2010.

SIMON, H. Y. et al. Benchmarking metagenomics tools for taxonomic classification. *Cell*, v. 178, n. 4, p. 779-794, 2019.

SIMPSON-LOURÊDO, L. et al. Detection and virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a concurrent diphtheria and infectious mononucleosis case. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 112, n. 7, p. 1055-1065, 2019.

SING, A. et al. Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 49, n. 7, p. 2485-2489, 2011.

SINGH-GREWAL, D.; MACDESSI, J.; CRAIG, J. Circumcision for the prevention of urinary tract infection in boys: a systematic review of randomised trials and observational studies. *Arch. Dis. Childh.*, v. 90, n. 8, p. 853-858, 2005.

SLINGER, B. L. et al. Potent modulation of the CepR quorum sensing receptor and virulence in a *Burkholderia cepacia* complex member using non-native lactone ligands. *Sci. Rep.*, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. Brunner & Suddarth, Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. In: *Brunner & Suddarth, Tratado de enfermagem médico-cirúrgica*. 2005. p. 1133-1133.

SMITH, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 57, n. 10, p. 1539-1550, 2005.

SMITH, K. F. et al. Regulation and activity of a zinc uptake regulator, *Zur*, in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.*, v. 191, n. 5, p. 1595-1603, 2009.

SOMMER, M. O. A.; DANTAS, G.; CHURCH, G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, v. 325, n. 5944, p. 1128-1131, 2009.

SOTO, G. E.; HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.*, v. 181, n. 4, p. 1059-1071, 1999.

SOUZA, C. et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 2, p. 242-248, 2015.

SOUZA, C. et al. Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 112, n. 9, p. 1331-1340, 2019.

SOUZA, C. et al. Resistance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum*. *Microb. Drug Resist.*, v. 26, n. 12, p. 1546-1558, 2020.

SOUZA, M. C. et al. Biofilm formation and fibrinogen and fibronectin binding activities by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* invasive strains. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 107, n. 6, p. 1387-1399, 2015.

SPANO, L. C.; et al. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. *BMC Infect. Dis.*, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2017.

STAPLETON, A. E. Urinary tract infection pathogenesis: host factors. *Infect. Dis. Clin.*, v. 28, n. 1, p. 149-159, 2014.

STAPLETON, A. E. et al. Recurrent urinary tract infection and urinary *Escherichia coli* in women ingesting cranberry juice daily: a randomized controlled trial. In: *Mayo Clin. Proc.* Elsevier, v. 87, n. 2, p. 143-150, 2012.

STEWART, P.S. et al. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n. 2, p. 836-838, 2000.

SUSAN VAN, D. et al. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.*, v. 17, n. 1\_suppl, p. s3-s8, 2010.

SUSKIND, A. M. et al. Incidence and management of uncomplicated recurrent urinary tract infections in a national sample of women in the United States. *Urol.*, v. 90, p. 50-55, 2016.

SUWANTARAT, N. et al. Practical utility and accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Corynebacterium* species and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 145, n. 1, p. 22-28, 2016.

SWIERCZYNSKI, A.; TON-THAT, H. Type III Pilus of Corynebacteria: Pilus Length Is Determined by the Level of Its Major Pilin Subunit. *J. Bacteriol.*, v. 188, n. 17, p. 6318-6325, 2006.

SZEMRAJ, M.; KWASZEWSKA, A.; SZEWCZYK, E. M. New gene responsible for resistance of clinical Corynebacteria to macrolide, lincosamide and streptogramin. *B. Pol. J. Microbiol.*, v. 67, n. 2, p. 237-240, 2018.

SZEMRAJ, M. et al. Differences in distribution of MLS antibiotics resistance genes in clinical isolates of staphylococci belonging to species: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* and *S. warneri*. *BMC Microbiol.*, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.

SZWEDA, H.; JÓŹWIK, M. Urinary tract infections during pregnancy-an updated overview. *Dev Period Med*, v. 20, n. 4, p. 263-272, 2016.

TANG, H. J.; CHAO, C. M. Nontyphoidal *Salmonella* urinary tract infection among elderly patients. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* v. 49, n. 1, p. 157, 2016.

TAUCH, A. et al. Insights into the genetic organization of the *Corynebacterium diphtheriae* erythromycin resistance plasmid pNG2 deduced from its complete nucleotide sequence. *Plasmid*, v. 49, n. 1, p. 63-74, 2003.

TAUCH, A. et al. The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Mol. Gen. Genet.*, v. 263, n. 1, p. 1-11, 2000.

TAYE, S. et al. Bacterial profile, antibiotic susceptibility pattern and associated factors among pregnant women with Urinary Tract Infection in Goba and Sinana Woredas, Bale Zone, Southeast Ethiopia. *BMC Res. Notes*, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2018.

THEEL, E. S. et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 9, p. 3093-3095, 2012.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, ampC, and carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.*, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TIWARI, S. et al. *C. pseudotuberculosis* Phop confers virulence and may be targeted by natural compounds. *Integr. Biol.*, v. 6, n. 11, p. 1088-1099, 2014.

TON-THAT, H.; MARRAFFINI, L. A.; SCHNEEWIND, O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, v. 1694, n. 1-3, p. 269-278, 2004.

TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.*, v. 50, n. 4, p. 1429-1438, 2003.

TORIBIO, A. et al. In vitro adherence of conjunctival bacteria to different oculoplastic materials. *Int. J. Ophthalmol.*, v. 11, n. 12, p. 1895, 2018.

TORRES, L. F. C. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 272-279, 2013.

TRACZ, D. M. et al. Increase in ampC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT–PCR. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 55, n. 5, p. 768-772, 2005.

TROST, E. et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genomics*, v. 12, n. 1, p. 1-17, 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.*, v. 194, n. 12, p. 3199-3215, 2012.



- TROST, E. et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2010.
- TRUZZI, J. C. I. et al. Residual urinary volume and urinary tract infection—when are they linked? *J. Urol.*, v. 180, n. 1, p. 182-185, 2008.
- TRZECIAK, S. et al. Infections and severe sepsis in solid-organ transplant patients admitted from a university-based ED. *Am. J. Emerg. Med.*, v. 22, n. 7, p. 530-533, 2004.
- TSINZERLING, A. V. et al. Tonsils in diphtheria and the *Corynebacterium diphtheriae* carrier state. *Ark. Patol.*, v. 42, n. 8, p. 75-80, 1980.
- URSELL, L. K. et al. Defining the human microbiome. *Nutr. Rev.*, v. 70, n. suppl\_1, p. S38-S44, 2012.
- VARELA, C. A.; BAEZ, M. E.; AGOSIN, E. Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 7, p. 4222-4229, 2004.
- VASUDEVAN, R. Urinary tract infection: an overview of the infection and the associated risk factors. *J. Microbiol. Exp.*, v. 1, n. 2, p. 00008, 2014.
- VENGADESAN, K.; NARAYANA, L. Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins. *Protein Sci.*, v. 20, p. 759-772, 2011.
- VENKATESAN, A. et al. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clin. Infect. Dis.*, v. 57, n. 8, p. 1114-1128, 2013.
- VENMANS, L. M. A. J. et al. Incidence and antibiotic prescription rates for common infections in patients with diabetes in primary care over the years 1995 to 2003. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 13, n. 6, p. e344-e351, 2009.
- VERSALOVIC, J. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2011.
- VERVIER, K. et al. Large-scale machine learning for metagenomics sequence classification. *Bioinformatics*, v. 32, n. 7, p. 1023-1032, 2016.
- VIEIRA NETO, O. M. Infecção do trato urinário. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 36, n. 2/4, p. 365-369, 2003.
- VILA, J. et al. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 5, p. 1745-1747, 2012.

- VILLEGAS, M. V. et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.
- VIMR, E.; LICHTENSTEIGER, C. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol.*, v. 10, n. 6, p. 254-257, 2002.
- VOISIN, S. et al. Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. striatum* and related species by pyrolysis-gas-liquid chromatography with atomic emission detection. *Res. Microbiol.*, v. 153, n. 5, p. 307-311, 2002.
- VRIES, L. E. et al. The gut as reservoir of antibiotic resistance: microbial diversity of tetracycline resistance in mother and infant. *PLoS One*, v. 6, n. 6, p. e21644, 2011.
- WAGENLEHNER, F. M. E.; NABER, K. G. Treatment of bacterial urinary tract infections: presence and future. *Eur. Urol.*, v. 49, n. 2, p. 235-244, 2006.
- WALSH, T. R. et al. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.
- WANG, C. C.; MATTSON, D.; WALD, A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. *Bone Marrow Transplant.*, v. 27, n. 4, p. 445-449, 2001.
- WANG, J. et al. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v. 10, n. 12, p. 1299-1305, 2016.
- WANG, M. C. et al. Bacterial characteristics and glycemic control in diabetic patients with *Escherichia coli* urinary tract infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013.
- WANG, X. et al. Whole-genome sequencing reveals a prolonged and persistent intrahospital transmission of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, v. 57, n. 9, p. e00683-19, 2019.
- WATERFIELD, N. R. et al. Rapid Virulence Annotation (RVA): identification of virulence factors using a bacterial genome library and multiple invertebrate hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 105, n. 41, p. 15967-15972, 2008.
- WAUTERS, G. et al. Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 5, p. 1430-1432, 1998.
- WEBB, J. S. Differentiation and Dispersal in Biofilms. In: *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations*. Wymondham, UK: Horizon Bioscience, 2007. p. 165-174.
- WEERASEKERA, D. et al. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiol.*, v. 165, n. 8, p. 876-890, 2019.

WEN, H. et al. Analysis of *Caenorhabditis elegans* in microfluidic devices. *Sci. China Chem.*, v. 55, n. 4, p. 484-493, 2012.

WERNER H., KUNTSCHKE J. Infection in the elderly-what is different? *Z. Gerontol. Geriatr.*, v. 33, n. 5, p:350-6, 2000.

WHITESIDE, S. A. et al. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat. Rev. Urol.*, v. 12, n. 2, p. 81-90, 2015.

WIDMAIER, E. P., RAFF, H., STRANG, K. T. *Vander Fisiologia Humana: os mecanismos das funções corporais*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

WOODFORD, H. J. et al. Bacteremic urinary tract infection in hospitalized older patients—are any currently available diagnostic criteria sensitive enough? *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 59, n. 3, p. 567-568, 2011.

WU, Y. H. et al. Risk factors and clinical impact of levofloxacin or cefazolin nonsusceptibility or ESBL production among uropathogens in adults with community-onset urinary tract infections. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 47, n. 3, p. 197-203, 2014.

YACOUB, R. et al. Urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in renal transplant recipients. *J. Glob. Infect. Dis.*, v. 3, n. 4, p. 383, 2011.

YADAV, S.K. et al. Prevalence of UTI among Diabetic. *Annals Int. Med. Dent. Res*, v.1: p. 264-267, 2015.

YAMAMURO, R. et al. Clinical Characteristics of *Corynebacterium* Bacteremia Caused by Different Species, Japan, 2014–2020. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 27, n. 12, p. 2981, 2021.

YAMAZOE, K. et al. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, n. 11, p. 2808-2810, 1999.

YANAGAWA, R.; HONDA, E. Presence of pili-species of human and animals parasites and pathogens of 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, n. 1, p. 31-37, 1968.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 52, n. 2, p. 809, 2008.

ZASADA, A. A. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. *Przegl. Epidemiol.*, v. 69, n. 3, p. 439-44, 2015.

ZASADA, A. A.; MOSIEJ, E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 66, n. 6, p. 472-483, 2018.

ZHANEL, G. G.; NICOLLE, L E.; HARDING, G. K. M. Prevalence of asymptomatic bacteriuria and associated host factors in women with diabetes *mellitus*. *Clinical infectious diseases*, v. 21, n. 2, p. 316-322, 1995.

ZIMMERLI, W. et al. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.*, v. 351, n. 16, p. 1645-1654, 2004.

## APÊNDICE – Produção científica durante a realização do doutorado

### Artigos completos publicados em periódicos

1. HEGGENDORNN, L. H., **GOMES, S. W. C.**, DE ARAÚJO LONGO, L. G., DA CUNHA, G. A., PÓVOA, H. C. C. *Paenibacillus stellifer*: a new cause of human infections. Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, v. 21, p. 83-87, 2019.

### Trabalhos publicados em anais de eventos nacionais (resumo)

1. HEGGENDORNN, L. H., **GOMES, S. W. C.**; LONGO, L. G. A; VIANA, V. G.; FERNANDES A. F., HIRATA JR., R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; POVOA, H. C. C. Potencial de virulência de amostras de *Corynebacterium* spp. isoladas de pacientes hospitalizados. In: Anais da Exposição de Trabalhos Acadêmicos da Região Serra, 2019. v.1. p. 1-1

1. **GOMES, S. W. C.**; HEGGENDORNN, L. H.; LONGO, L. G. A.; SCHIMIDT, D. B.; SANTANNA, L. O.; SANTOS, L. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; POVOA, H. C. C. Multidrug-resistant *Corynebacterium amycolatum* strains identified as pathogens of community-acquired urinary tract infections In: Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021. v. 1. p. 1-1

2. **GOMES, S. W. C.**; SANTANNA, L. O.; HEGGENDORNN, L. H.; LONGO, L.G.A.; SANTOS, L. S.; POVOA, H. C. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L. *In silico* analysis of genes potentially involved in resistance to antimicrobial agents of *Corynebacterium amycolatum* In: Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021. v. 1. p. 1-1

3. SANTANNA, L. O.; **GOMES, S. W. C.**; HEGGENDORNN, L. H.; ARAÚJO, M. R. B.; POVOA, H. C. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; SANTOS, L. S. Genomic taxonomy as an essential tool in studies including inconsistent identifications of *Corynebacterium* species. In: Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021. v. 1. p. 1-1

4. HEGGENDORNN, L. H.; **GOMES, S. W. C.**; LONGO, L.G.A.; SCHIMIDT, D. B.; SANTANNA, L. O.; SANTOS, L. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; POVOA, H. C. C. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Corynebacterium amycolatum* strains in mountainous region of rio de janeiro state. In: Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021. v. 1. p. 1-1

#### Prêmios

1. Melhor apresentação em pôster da IV Exposição de Trabalhos acadêmicos da Região Serrana, 2018.