



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Fellipe de Oliveira Cabral**

**Influência da disponibilidade de ferro em mecanismos de sobrevivência,  
resistência a agentes antimicrobianos e formação de biofilme de  
*Corynebacterium striatum***

Rio de Janeiro

2021

Fellipe de Oliveira Cabral

**Influência da disponibilidade de ferro em mecanismos de sobrevivência, resistência a agentes antimicrobianos e formação de biofilme de *Corynebacterium striatum***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientador: Prof. Dr. Cassius de Souza

Rio de Janeiro

2021

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

C117 Cabral, Fellipe de Oliveira.

Influência da disponibilidade de ferro em mecanismos de sobrevivência, resistência a agentes antimicrobianos e formação de biofilme de *Corynebacterium striatum* / Fellipe de Oliveira Cabral – 2021. 118f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi  
Coorientador: Prof. Dr. Cassius de Souza

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

1. *Corynebacterium striatum* - Teses. 2. Virulência (Microbiologia) - Teses. 3. Biofilme - Teses. 4. Infecção hospitalar – Teses. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Souza, Cassius de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.871

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Fellipe de Oliveira Cabral

**Influência da disponibilidade de ferro em mecanismos de sobrevivência, resistência a agentes antimicrobianos e formação de biofilme de *Corynebacterium striatum***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de dezembro de 2021.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Cassius de Souza

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Liliane Simpson Lourêdo

Instituto Municipal de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e de Inspeção Agropecuária

Rio de Janeiro

2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu Deus, à minha família, especialmente aos meus pais Ismael e Rosangela, a minha tia/mãe Abdná, e também, a todos aqueles que me apoiaram durante o período do mestrado.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que cuida de mim, em todo tempo, mostrando Seu zelo, como um pai atencioso, generoso e gracioso.

Aos meus pais, Ismael e Rosangela, por simplesmente tudo, por me dedicarem amor, atenção e todas as coisas necessárias para uma pessoa ser bem-sucedida na vida. À minha tia Ná, que também me dispensou um carinho único desde criança, todos os momentos que me proporcionou, marcando a minha vida com o que há de melhor em todos os aspectos, quando eu crescer quero ser igual a ela.

Ao LDCIC (L3), especialmente à Elisabete Cappelli e Andrezza Cucinelli, pela dedicação e solicitude em tirar minhas dúvidas e compartilhar suas experiências e ao Yuri Faria por, além de compartilhar seus conhecimentos e experiências, mediar e realizar todo o procedimento da obtenção das imagens de MEV.

À minha orientadora Ana Guaraldi, pela confiança, incentivo e investimento.

Ao meu coorientador Cassius, por me acompanhar de perto, sempre preocupado com a realização e o bom andamento de todo este trabalho.

Ao inesquecível professor Raphael Hirata Júnior (in memoriam), pelas ideias, ensinamentos, contas de matemática e tudo mais e pelo inestimável legado deixado.

À professora Cíntia, por todo apoio, criatividade, investimento, lanches durante todo o período que estive no LDCIC.

À Cecília e Bárbara, pelo auxílio na identificação por MALDI-TOF.

Aos professores, pela transmissão de conhecimentos e compartilhamento de experiências.

A todo corpo técnico-administrativo da FCM, PPGMICRO e DMIP, pelo apoio.

Agradeço às instituições de apoio financeiro, CAPES, CNPq, FAPERJ e SR2-UERJ pelo financiamento de todo este trabalho.

Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se veem.

*Carta aos Hebreus, capítulo 11, versículo 1.*

## RESUMO

CABRAL, Fellipe de Oliveira. **Influência da disponibilidade de ferro em mecanismos de sobrevivência, resistência a agentes antimicrobianos e de formação de biofilme de *Corynebacterium striatum***. 2021. 118 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

*Corynebacterium striatum* tem sido associado a um número crescente de infecções relacionadas à assistência à saúde. Atributos de virulência como multirresistência, habilidade de aderir às superfícies e constituir biofilme, podem se associar e contribuir para a patogenicidade bacteriana. A biodisponibilidade de micronutrientes, como metais de transição, pode influenciar o curso das infecções através da inibição/desrepressão de vias metabólicas fundamentais para a persistência bacteriana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a habilidade de formação de biofilme e a influência de diferentes concentrações de ferro sobre células sésseis e planctônicas de *C. striatum* utilizando amostras isoladas durante (agosto/2009 a abril/2010) e após o surto nosocomial, no Hospital Universitário Pedro Ernesto. Inicialmente, as amostras BR1987/I, BR2369/II, BR2130/V, BR2237/VI, BR2296/VII, BR2103/VIII e 2425/IX apresentaram perfil de multirresistência enquanto BR1961/III, BR1954/IV e BR2376/X foram consideradas multisensíveis. Tanto sob limitação quanto sob suplementação de ferro, algumas amostras se tornaram sensíveis a moxifloxacina; outras se tornaram sensíveis a rifampicina; e a amostra BR2376/X adquiriu perfil multirresistente. Todas as amostras testadas foram capazes de aderir à superfície de poliuretano e vidro com maior viabilidade celular para BR1987/I; as demais, não diferiram quanto à contagem de células viáveis. Quando submetidas à limitação de ferro, algumas amostras sofreram inibição total da aderência ao vidro, exceto BR1961/III que sofreu redução, BR1954/IV, que aumentou sua produção de biofilme, e BR2376/X, que não alterou seu perfil de aderência. A suplementação de ferro não produziu mudança do perfil de aderência ao vidro para: BR1987/I, BR2130/V, BR2103/VIII e BR2376/X, enquanto, BR2369/II e BR1961/III sofreram redução e BR1954/IV, BR2237/VI, BR2296/VI, BR2425/IX aumento da produção de biofilme. A limitação de ferro produziu redução da aderência e produção de biofilme em poliestireno por todas as amostras. Sob suplementação de ferro, houve redução da aderência e produção de biofilme em poliestireno, contudo, essa redução somente foi significativa para três amostras. Quanto à viabilidade celular no biofilme, BR1987/I apresentou as maiores contagens. Excetuando-se BR1961/III e BR2103/VIII, que sofreram redução, todas as amostras analisadas sofreram aumento da viabilidade nos biofilmes sob limitação de ferro. Sob suplementação de ferro: BR1987/I não foi afetada, enquanto, BR2369/II, BR1954/IV e BR2103/VIII revelaram aumento e BR1961/III sofreu redução da viabilidade. Análises de microscopia indicaram que não há diferença na natureza da matriz secretada no biofilme em qualquer das condições testadas, sendo a matriz de natureza, majoritariamente, proteica. A microscopia também revelou que a limitação de ferro induziu alongamento celular em todas as amostras testadas e que este alongamento pode ser revertido quando as células alongadas são submetidas ao crescimento em meio inalterado na concentração de ferro. Os resultados indicam que o ferro modula propriedades adesivas, morfológicas e de sensibilidade aos antimicrobianos em *C. striatum* e enfatizam que este patógeno não deve ser subestimado ou descartado como contaminante pelos profissionais da saúde. Portanto, é necessário empenho no monitoramento e elaboração de estratégias para prevenção, controle e tratamento de infecções por esta corinebactéria.

Palavras-chave: *Corynebacterium striatum*. Biofilme. Ferro. Multirresistência. Virulência. Surto nosocomial. Filamentação.



## ABSTRACT

CABRAL, Fellipe de Oliveira. **Influence of iron availability on survival, antimicrobial resistance and biofilm formation mechanisms of *Corynebacterium striatum***. 2021. 118 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

*Corynebacterium striatum* has been associated with an increasing number of healthcare-related infections. Virulence attributes such as multi-resistance, ability to adhere to surfaces and build biofilm, can be associated and contribute to bacterial pathogenicity. The bioavailability of micronutrients, such as transition metals, can influence the course of infections through the inhibition/derepression of key metabolic pathways for bacterial persistence. The objective of this work was to evaluate the ability of biofilm formation and the influence of different iron concentrations on sessile and planktonic cells of *C. striatum* using isolated samples during (August/2009 to April/2010) and after the nosocomial outbreak, at the Hospital University student Pedro Ernesto. Initially, samples BR1987/I, BR2369/II, BR2130/V, BR2237/VI, BR2296/VII, BR2103/VIII and 2425/IX showed a multi-resistance profile while BR1961/III, BR1954/IV and BR2376/X were considered multi-sensitive. Under both iron limitation and supplementation, some samples became sensitive to moxifloxacin; others became sensitive to rifampicin; and the BR2376/X sample acquired a multiresistant profile. All tested samples were able to adhere to the polyurethane and glass surface with greater cell viability for BR1987/I; the others did not differ in terms of viable cell count. When submitted to iron limitation, some samples suffered total inhibition of adherence to glass, except for BR1961/III, which was reduced, BR1954/IV, which increased its biofilm production, and BR2376/X, which did not change its adhesion profile. Iron supplementation did not change the glass adhesion profile to BR1987/I, BR2130/V, BR2103/VIII and BR2376/X, while BR2369/II and BR1961/III were reduced and BR1954/IV, BR2237/VI, BR2296/VI, BR2425/IX increased biofilm production. Iron limitation produced reduced adhesion and biofilm production on polystyrene for all samples. Under iron supplementation, there was a reduction in adhesion and biofilm production in polystyrene, however, this reduction was only significant for three samples. As for cell viability in the biofilm, BR1987/I had the highest counts. Except for BR1961/III and BR2103/VIII, which were reduced, all analyzed samples had increased viability in biofilms under iron limitation. Under iron supplementation: BR1987/I was not affected, while BR2369/II, BR1954/IV and BR2103/VIII showed an increase and BR1961/III suffered a reduction in viability. Microscopy analysis indicated that there is no difference in the nature of the matrix secreted in the biofilm under any of the conditions tested, the matrix being mostly protein in nature. Microscopy also revealed that iron limitation induced cell elongation in all tested and that this elongation can be reversed when the elongated cells are submitted to growth in medium unaltered in the iron concentration. The results indicate that iron modulates adhesive, morphological and antimicrobial sensitivity properties in *C. striatum* and emphasize that this pathogen should not be underestimated or discarded as a contaminant by healthcare professionals. Therefore, it is necessary to commit to monitoring and planning for the prevention, control and treatment of infections caused by this corynebacterium.

Keywords: *Corynebacterium striatum*. Biofilm. Iron. Multidrug-resistance. Virulence.

Nosocomial outbreak. Filamentation.

## LISTA DE FIGURAS

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 –  | Desenvolvimento de um biofilme.....                                                                                                                                                                                                                                 | 27 |
| Figura 2 –  | Reação de Fenton.....                                                                                                                                                                                                                                               | 33 |
| Figura 3 –  | Esquema simplificado da análise qualitativa e semiquantitativa da formação de biofilme em superfície hidrofílica de vidro.....                                                                                                                                      | 44 |
| Figura 4 –  | Biofilme em poliuretano.....                                                                                                                                                                                                                                        | 60 |
| Figura 5 –  | Análise semi-quantitativa de capacidade de aderência e formação de biofilme em superfície hidrofílica abiótica de vidro de dez amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> oriundas de surto nosocomial de hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro..... | 62 |
| Figura 6 –  | Análise quantitativa da produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico de vidro de amostras <i>Corynebacterium striatum</i> isoladas durante surto ocorrido em hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro.....                        | 63 |
| Figura 7 –  | Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico (vidro), sob condições de limitação de ferro, por cepas <i>Corynebacterium striatum</i> oriundas de surto nosocomial de hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro.....                | 68 |
| Figura 8 –  | Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico (vidro), por cepas <i>Corynebacterium striatum</i> oriundas de hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro crescidas em meio suplementado com sulfato ferroso.....                                   | 71 |
| Figura 9 –  | Propriedades adesivas, viabilidade bacteriana e produção de biofilme em superfície abiótica de natureza hidrofóbica de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> (n=10) avaliadas pela técnica semi-quantitativa realizada em microplacas de poliestireno.....    | 74 |
| Figura 10 – | Habilidade de produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno) de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> oriundas de hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro.....                                                             | 77 |

|             |                                                                                                                                                                          |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11 – | Habilidade de produção de biofilme superfície hidrofóbica de lamínulas de Thermanox® de cinco amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> .....                          | 80 |
| Figura 12 – | Morfologia celular de formas planctônicas de <i>Corynebacterium striatum</i> .....                                                                                       | 82 |
| Figura 13 – | Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lamínulas de Thermanox® pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> BR1987/I-MD.....    | 84 |
| Figura 14 – | Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lamínulas de Thermanox® pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> BR2369/II-MDR.....  | 85 |
| Figura 15 – | Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lamínulas de Thermanox® pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> BR1961/III-MDS..... | 86 |
| Figura 16 – | Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lamínulas de Thermanox® pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> BR1954/IV-MDS.....  | 87 |
| Figura 17 – | Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lamínulas Thermanox® formado pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> MDR 1987BR-RJ/PFGE-I.....                 | 90 |
| Figura 18 – | Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lamínulas Thermanox® formado pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> MDR 2369BR-RJ/PFGE-II.....                | 91 |
| Figura 19 – | Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lamínulas Thermanox® formado pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> MDS 1961BR-RJ/PFGE-III.....               | 92 |
| Figura 20 - | Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lamínulas Thermanox® formado pela amostra <i>Corynebacterium striatum</i> MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV.....                | 93 |

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Origem das amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> previamente isoladas de pacientes internados em unidades hospitalares localizadas na região metropolitana do Rio de Janeiro utilizadas no presente estudo.....                                                                              | 40 |
| Tabela 2 – | Resultados dos testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (n=21) utilizando o método de disco-difusão de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> representantes de diferentes perfis genotípicos (PFGE-I a X) isoladas de pacientes infectados durante e pós-surto nosocomial..... | 51 |
| Tabela 3 – | Perfis de Multirresistência – MDR e de Susceptibilidade – MDS de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> com diferentes perfis genotípicos (PFGE-I a X) e isoladas de pacientes infectados durante e pós-surto nosocomial.....                                                                 | 52 |
| Tabela 4 – | Influência de condições de limitação de ferro nos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (n=11) de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> (PFGE-I a X) pré-cultivados na ausência e na presença de quelante 2,2'-dipyridyl (48h).....                                         | 55 |
| Tabela 5 – | Influência de condições de suplementação de ferro nos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (n=11) de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> (PFGE-I a X) pré-cultivados na ausência e na presença de sulfato ferroso (48h).....                                             | 57 |
| Tabela 6 – | Perfis de multirresistência – MDR e de susceptibilidade – MDS a agentes antimicrobianos de amostras clínicas de <i>Corynebacterium striatum</i> (n=10) pertencentes a diferentes pulsotipos (PFGE-I a X) pré-cultivadas sob condições de limitação e suplementação de ferro.....                   | 58 |
| Tabela 7 – | Propriedades adesivas, viabilidade de formas sésseis e produção de biofilme na superfície hidrofílica de vidro de amostras clínicas de <i>Corynebacterium striatum</i> previamente isoladas em unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de Janeiro*.....                                  | 64 |

|             |                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 8 –  | Influência de condições de limitação de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície hidrofílica de vidro de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> .....                                           | 67 |
| Tabela 9 –  | Influência de condições ambientes com níveis mais elevados de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro de <i>Corynebacterium striatum</i> .....                                             | 70 |
| Tabela 10 – | Perfis de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e de produção de biofilme na superfície hidrofílica do vidro de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> expressos em diferentes concentrações de ferro..... | 73 |
| Tabela 11 – | Análise semi-quantitativa e quantitativa da produção de biofilme em poliestireno e lamínulas de Thermanox® por amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> .....                                                      | 81 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |                                                                           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|
| ANVIS     | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                                  |
| A         | Bastonetes Gram-Positivos Irregulares                                     |
| BGPIs     | Brasil                                                                    |
| BR        | Comissão de Controle as Infecções Hospitalares                            |
| CCIH      | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>                         |
| CDC       | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>                            |
| CLSI      | Centro de Tratamento de Queimados                                         |
| CTQ       | Centro de Terapia Intensiva                                               |
| CTI       | Ácido desoxirribonucleico                                                 |
| DNA       | Densidade Óptica                                                          |
| D.O.      | Doenças Infecciosas e Parasitárias                                        |
| DIP       | Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia                  |
| DMIP      | Exopolissacarídeo                                                         |
| EPS       | Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| FCM/UERJ  | Hospital Universitário Pedro Ernesto                                      |
| HUPE      | Infecção Hospitalar                                                       |
| IH        | Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde                              |
| IRAS      | Lipopolissacarídeo                                                        |
| LPS       | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>       |
| MALDI TOF | Multirresistência aos Agentes Antimicrobianos                             |
| MDR       |                                                                           |
| MDS       | Multissensibilidade aos Agentes Antimicrobianos                           |
| NCBI      | <i>National Center for Biotechnology Information</i>                      |
| NCCLS     | <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>               |
| OMS       | Organização Mundial da Saúde                                              |
| PBS       | Solução Salina Tamponada Fosfatada                                        |
| PFGE      | <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>                                   |
| PPGMICRO  | Programa de Pós Graduação em Microbiologia                                |
| pH        | Potencial hidrogênio                                                      |
| RNA       | Ácido Ribonucleico                                                        |
| RJ        | Rio de Janeiro                                                            |

|       |                                           |
|-------|-------------------------------------------|
| S     | Sensibilidade aos agentes antimicrobianos |
| Sac + | Bacilo Fermentador de Sacarose            |
| SPE   | Substância Polimérica Extracelular        |
| TD    | Toxina Diftérica                          |
| TSA   | <i>Trypticase Soy Agar</i>                |
| TSB   | <i>Trypticase Soy Broth</i>               |
| UCI   | Unidade de Cuidados Intensivos            |
| UFC   | Unidade Formadora de Colônia              |
| UTI   | Unidade de Terapia intensiva              |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| %                 | Porcentagem         |
| ±                 | Mais ou menos       |
| ×                 | Multiplicação       |
| °C                | Graus Celsius       |
| H <sub>2</sub> O  | Molécula da água    |
| FeSO <sub>4</sub> | Sulfato Ferroso     |
| mL                | Mililitro           |
| nm                | Nanômetro           |
| cm                | Centímetro          |
| µg                | Micrograma          |
| rpm               | Rotações por minuto |
| µL                | Microlitro          |
| n                 | Número amostral     |
| n°                | Número              |
| h                 | Horas               |



## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                   |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|          | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                            | <b>19</b> |
| <b>1</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                            | <b>37</b> |
| 1.1      | <b>Geral .....</b>                                                                                                                                | <b>37</b> |
| 1.2      | <b>Específicos .....</b>                                                                                                                          | <b>37</b> |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                   | <b>39</b> |
| 2.1      | <b>Origem, identificação e estocagem das amostras bacterianas.....</b>                                                                            | <b>39</b> |
| 2.2      | <b>Testes de susceptibilidade e caracterização dos perfis de multirresistência aos agentes antimicrobianos.....</b>                               | <b>40</b> |
| 2.3      | <b>Influência de concentrações ferro na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.....</b>                                                     | <b>41</b> |
| 2.4      | <b>Interação bacteriana e produção de biofilme em superfícies abióticas.....</b>                                                                  | <b>41</b> |
| 2.4.1    | <u>Aderência e produção de biofilme em cateter de poliuretano.....</u>                                                                            | <b>42</b> |
| 2.4.1.1  | Técnica de rolamento (Maki-Teste).....                                                                                                            | 42        |
| 2.4.1.2  | Análise quantitativa da produção de biofilme em cateter de poliuretano.....                                                                       | 42        |
| 2.4.2    | <u>Pesquisa de aderência, viabilidade bacteriana e produção de biofilme na superfície de vidro.....</u>                                           | <b>43</b> |
| 2.4.2.1  | Ensaio de aderência e produção de biofilme na superfície de tubos de vidro.....                                                                   | 43        |
| 2.4.2.2  | Ensaio de produção de biofilme em lamínulas de vidro.....                                                                                         | 43        |
| 2.4.3    | <u>Ensaio de aderência, viabilidade bacteriana e produção de biofilme em superfície de poliestireno.....</u>                                      | <b>44</b> |
| 2.4.3.1  | Análise semi-quantitativa da produção de biofilme em poliestireno.....                                                                            | 44        |
| 2.4.3.2  | Ensaio quantitativo de formas sésseis viáveis em superfícies de poliestireno....                                                                  | 45        |
| 2.5      | <b>Influência de concentrações ferro na viabilidade bacteriana, propriedades adesivas e de formação de biofilme em superfícies abióticas.....</b> | <b>45</b> |
| 2.5.1    | <u>Ensaio de aderência e de formação de biofilme na superfície do vidro.....</u>                                                                  | <b>45</b> |
| 2.5.2    | <u>Ensaio de aderência e de formação de biofilme na superfície de plástico poliestireno.....</u>                                                  | <b>46</b> |
| 2.5.3    | <u>Análise morfo-tintorial e da composição química estrutural de biofilmes em superfície poliestireno.....</u>                                    | <b>46</b> |
| 2.5.4    | <u>Técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....</u>                                                                                  | <b>46</b> |

|         |                                                                                                                                                            |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.5   | <u>Experimentos de análise da influência de condições de limitação de ferro na divisão e morfologia bacteriana.....</u>                                    | 47 |
| 3       | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                     | 48 |
| 3.1     | <b>Susceptibilidade de amostras de <i>C. striatum</i> aos agentes antimicrobianos.....</b>                                                                 | 48 |
| 3.1.1   | <u>Perfis de multirresistência-MDR aos agentes antimicrobianos.....</u>                                                                                    | 49 |
| 3.1.2   | <u>Influência de condições de limitação de ferro na susceptibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos.....</u>                                       | 50 |
| 3.1.3   | <u>Influência da suplementação de ferro na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.....</u>                                                           | 54 |
| 3.2     | <b>Interação bacteriana e produção de biofilme em superfícies abióticas.....</b>                                                                           | 58 |
| 3.2.1   | <u>Aderência e produção de biofilme em cateter de poliuretano.....</u>                                                                                     | 58 |
| 3.2.2   | <u>Propriedades adesivas, viabilidade bacteriana e produção de biofilme na superfície de vidro.....</u>                                                    | 61 |
| 3.2.2.1 | Influência de diferentes concentrações ferro na aderência e produção de biofilme em superfícies hidrofílicas de vidro.....                                 | 65 |
| 3.2.2.2 | Influência de condições de limitação de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro.....                                            | 65 |
| 3.2.2.3 | Influência de condições de suplementação de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro.....                                        | 68 |
| 3.2.2.4 | Heterogeneidade amostra-dependente da capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro em condições de limitação e de suplementação de ferro..... | 71 |
| 3.2.3   | <u>Propriedades adesivas, viabilidade bacteriana e produção de biofilme na superfície de poliestireno.....</u>                                             | 74 |
| 3.2.3.1 | Influência de concentrações ferro na aderência e produção de biofilme em superfícies hidrofóbicas de plástico: poliestireno e Thermanox®.....              | 75 |
| 3.2.3.2 | Influência de condições de limitação de ferro na produção de biofilme em superfícies de poliestireno.....                                                  | 75 |
| 3.2.3.3 | Influência de condições de suplementação de ferro na produção de biofilme em superfícies de poliestireno.....                                              | 75 |

|         |                                                                                                                                           |     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.3.4 | Influência de condições de limitação de ferro na viabilidade celular e produção de biofilme em lamínulas Thermanox®.....                  | 78  |
| 3.2.3.5 | Condições de suplementação de ferro na viabilidade celular e produção de biofilme em lamínulas Thermanox®.....                            | 79  |
| 3.3     | <b>Aspectos morfológicos de formas planctônicas e sésseis de células bacterianas cultivadas em diferentes concentrações de ferro.....</b> | 81  |
| 3.3.1   | <u>Influência de condições de limitação de ferro na morfologia de bactérias de vida livre.....</u>                                        | 82  |
| 3.3.2   | <u>Influência de condições de limitação de ferro na morfologia de bactérias de vida sésil.....</u>                                        | 82  |
| 3.3.3   | <u>Aspectos morfológicos e tintoriais de formas sésseis de células bacterianas e de biofilmes formados em lamínulas Thermanox®.....</u>   | 88  |
| 4       | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                     | 94  |
|         | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                     | 101 |
|         | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                  | 103 |
|         | <b>APÊNDICE – Produção científica no período do mestrado.....</b>                                                                         | 113 |



## INTRODUÇÃO

### Corinebactérias de importância médica

Os bacilos Gram positivos irregulares incluem diferentes gêneros de bactérias aeróbicas, pleomórficas, imóveis e não formadoras de esporos, sendo vários destacados pela relevância médica e veterinária: *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Brevibacterium*, *Gardnerella*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* (FUNKE & BERNARD, 2007).

Atualmente, já foram descritas aproximadamente 191 espécies e 13 subespécies para o gênero *Corynebacterium* (EUZÉBY, 2021), sendo pelo menos 36 destas consideradas de relevância médica. Algumas espécies podem ser encontradas e amplamente disseminadas no meio ambiente e determinadas espécies podem fazer parte da microbiota anfibiônica normal da pele e mucosas de animais e humanos.

Além das corinebactérias produtoras de toxina, que são considerados patógenos clássicos para humanos e/ou animais (*Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*), diferentes espécies, inicialmente consideradas patógenos oportunistas, vem sendo descritas como agentes etiológicos de infecções nosocomiais e comunitárias graves por vezes fatais (BAIO et al., 2013; WANG et al., 2019). Nas últimas duas décadas, o número de casos de infecções associadas com corinebactérias não produtoras de toxina diftérica (TD) reportado, tem sido crescente. Entretanto, o potencial patogênico destas espécies permanece subestimado por diversos profissionais da área de saúde, tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento (CLARRIDGE & SPIEGEL, 1995; STEINGRUBE et al., 1997; RIEGEL, 1998; CAMELLO, et al., 2009, CARVALHO et al., 2018).

Dentre os fatores predisponentes às infecções pelas diversas espécies de corinebactérias não produtoras de TD destacam-se os estados de malignidade, idade avançada, transplantes, infecção pelo HIV, diabetes, câncer, neutropenia, hospitalização e/ou antibioticoterapia por período prolongado além de procedimentos invasivos (cateterismo, implantes e válvulas). Em alguns casos, é difícil a distinção entre colonização e infecção. Embora a maioria das infecções graves por *Corynebacterium* spp. expressando perfil de multirresistência (MDR) aos agentes antimicrobianos seja atribuída a amostras de *Corynebacterium jeikeium*, casos de infecções por amostras MDR de outras espécies têm sido

descritos, incluindo *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* e *Corynebacterium striatum*, especialmente em ambientes de assistência à saúde (MARTINS et al, 2014; WANG et al, 2019).

Procedimentos laboratoriais e interpretações dos resultados de amostras clínicas de *Corynebacterium* spp. permanecem como um dos grandes desafios enfrentados pelos profissionais de saúde, devido principalmente à enorme diversidade desses microrganismos e ao número relativamente pequeno de provas bioquímicas convencionais disponíveis para sua diferenciação. Adicionalmente, algumas espécies ainda são consideradas como contaminantes de pele ou do ambiente, sendo caracterizadas como “difteroides”, além de muitos laboratórios clínicos utilizarem apenas testes identificação fenotípicos simplificados ou kits comerciais que conferem resultados limitados (JANDA, 1998; KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004; ALMUZARA et al, 2006; CAMELLO et al, 2008; SOUZA et al 2020).

Nos países em desenvolvimento a dificuldade que a maioria dos laboratórios enfrenta para a identificação de bastonetes Gram-positivos irregulares inclui a necessidade de treinamento da mão de obra especializada para o isolamento desses microrganismos de crescimento lento, além da utilização de inúmeros testes fenotípicos ou de procedimentos onerosos e/ou sofisticados incluindo: sistemas semi-automatizados, automatizados e da necessidade do sequenciamento gênico em algumas situações (QIUA et al., 2019). A reclassificação taxonômica de *Corynebacterium* spp. é frequente conforme aumenta o grau de conhecimento relativo às suas características fenotípicas e genotípicas. Dificultando ainda mais a valorização microbiológica e clínica do isolamento, a escolha do esquema de identificação para o diagnóstico laboratorial, a identificação de gênero e espécies além da antibioticoterapia.

### *C. striatum*

*C. striatum*, espécie inicialmente considerada como parte da microbiota anfiótica normal de pele e da mucosa nasal de humanos, vem sendo reconhecido como patógeno potencialmente virulento, capaz de causar infecções invasivas e surtos nosocomiais (MOORE et al. 2010; SYED et al., 2019; QIUA et al., 2019; 2009 LEE et al., 2005; WONG et al., 2010; SOUZA et al., 2020). Nas últimas décadas, tem se observado um número crescente de infecções invasivas causadas por amostras MDR e multissensíveis (MDS) de *C. striatum*, em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, incluindo: pneumonia (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1994; CREAGH et al., 2000; TARR et al., 2003; RENOM et al., 2007), sepse (DALL et al., 1989), sinovite e artrite séptica (CONE et al., 1998; SCHOLLE 2007), osteomielite (FERNÁNDEZ-AYALA et al., 2001), endocardite, meningite e bacteremia recorrente (WEISS et al., 1996; SYED et al., 2019). *C. striatum* também tem sido reconhecido como agente etiológico de abscessos hepáticos (STONE et al., 1997), peritonites (BHANDARI et al., 1995), feridas cirúrgicas (MOORE et al., 2010), queratites (HEIDEMANN et al., 1991) e infecções intrauterinas (BOLTIN et al., 2009). O primeiro caso de infecção urinária em paciente ambulatorial imunocompetente foi observado na Espanha (BETETA LOPEZ et al., 2009).

O número de relatos de casos de infecção pelo *C. striatum* tem aumentado em diversos países desenvolvidos, tais como: Itália, Espanha, Holanda, Estados Unidos, Hong Kong e Japão (BRANDENBURG et al., 1996; MARTIN et al., 2003; OTSUKA et al., 2006; RENOM et al., 2007; ADDERSON et al., 2008; CAMPANILE et al., 2009; MARTINS et al., 2009; WONG et al., 2010; WANG et al., 2019). Adicionalmente *C. striatum* tem sido isolado de diferentes tipos de infecções e surtos nosocomiais, em países em desenvolvimento incluindo o Brasil (CAMELLO et al., 2003; MARTINS et al., 2009; SUPERTI et al., 2009; SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2019; SOUZA et al., 2020).

Surtos epidêmicos causados por cepas MDR de *C. striatum* têm sido documentados em pacientes hospitalizados por longos períodos e/ou expostos, continuamente, a antimicrobianos de amplo espectro em unidades de terapia intensiva (LEONARD et al., 1994; BRANDENBURG et al., 1996; LEE et al., 2005; OTSUKA et al., 2006; RENOM et al., 2007; BOLTIN et al., 2009; WONG et al., 2010; WANG et al., 2019; QIUA et al., 2019). O uso de dispositivos médicos invasivos e a exposição a agentes antimicrobianos podem favorecer a infecção da mucosa do trato respiratório e a seleção de cepas MDR de *C. striatum* (SYED et

al., 2019). Portanto, amostras bastonetes Gram-positivos isoladas de material clínico não devem ser simplesmente descartadas como meros contaminantes, especialmente quando obtidas em cultura pura de pacientes imunocomprometidos e fazendo uso de dispositivos invasivos (MARTINS et al., 2009; WONG et al., 2010; BAIO et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

A necessidade de utilização de dispositivos médicos invasivos, incluindo aparelhos de auxílio respiratório, pode ocasionar a interação bacteriana com substrato abiótico e consequentemente favorecer a colonização e subsequente infecção do trato respiratório pelo *C. striatum* (SYED et al., 2019). Estudos anteriores também demonstraram a capacidade de disseminação de *C. striatum* de paciente para paciente e através das mãos contaminadas dos profissionais de saúde (BRANDENBURG et al., 1996).

### **Infecções relacionadas à assistência à saúde**

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), segundo o Ministério da Saúde são definidas como: qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. O sistema de saúde é desafiado constantemente pelas IRAS que representam um dos mais importantes problemas de Saúde Pública no mundo, acometendo tanto países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento. Além das elevadas taxas de morbidade e mortalidade, outras consequências são o aumento do tempo de internação e dos custos decorrentes tanto para a instituição quanto para os próprios pacientes e familiares, além da ameaça constante da disseminação de bactérias multirresistentes. Isso porque, o prolongamento do tempo de internação gera uma elevação no consumo de medicamentos e aumento dos custos adicionais, além de retardar o retorno do paciente às suas atividades normais (CDC, 2002; ANVISA, 2004; OLIVEIRA et al., 2009; SYDNOR & PERL, 2011).

Historicamente, no Brasil, o Controle das Infecções Hospitalares teve seu marco referencial com a Portaria do Ministério da Saúde nº 196, de 24 de junho de 1983, que instituiu a implantação de Comissões de Controle de Infecções Hospitalares em todos os hospitais do país, independentemente de sua natureza jurídica.

A Lei nº. 9.431, de 1997, dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção dos



Programas de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) em todos os hospitais. Nesta Lei, fica definido como PCIH, o “conjunto de ações desenvolvidas, deliberada e sistematicamente, com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares”. No entanto, é reconhecido, que muitos hospitais têm dificuldades ou não operacionalizam o PCIH conforme recomendações governamentais, principalmente aqueles longe dos grandes centros (GIUNTA & LACERDA, 2006).

A exigência de manutenção das Comissões de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH), Comissões Estaduais de Controle de Infecções Hospitalares (CECIH) e Comissões Municipais de Controle de Infecções Hospitalares (CMCIH) foi normalizada pelo Ministério da Saúde por meio da Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, que contextualiza a problemática das infecções também na dimensão do SUS, ao determinar as competências das três esferas de governo na sua prevenção (ANVISA, 2005).

### **Infecções relacionadas à assistência à saúde**

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), segundo o Ministério da Saúde são definidas como: qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. O sistema de saúde é desafiado constantemente pelas IRAS que representam um dos mais importantes problemas de Saúde Pública no mundo, acometendo tanto países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento. Além das elevadas taxas de morbidade e mortalidade, outras consequências são o aumento do tempo de internação e dos custos decorrentes tanto para a instituição quanto para os próprios pacientes e familiares, além da ameaça constante da disseminação de bactérias multirresistentes. Isso porque, o prolongamento do tempo de internação gera uma elevação no consumo de medicamentos e aumento dos custos adicionais, além de retardar o retorno do paciente às suas atividades normais (CDC, 2002; ANVISA, 2004; OLIVEIRA et al., 2009; SYDNOR & PERL, 2011).

Historicamente, no Brasil, o Controle das Infecções Hospitalares teve seu marco referencial com a Portaria do Ministério da Saúde nº 196, de 24 de junho de 1983, que instituiu a implantação de Comissões de Controle de Infecções Hospitalares em todos os hospitais do país, independentemente de sua natureza jurídica.

A Lei nº. 9.431, de 1997, dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção dos Programas

de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) em todos os hospitais. Nesta Lei, fica definido como PCIH, o “conjunto de ações desenvolvidas, deliberada e sistematicamente, com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares”. No entanto, é reconhecido, que muitos hospitais têm dificuldades ou não operacionalizam o PCIH conforme recomendações governamentais, principalmente aqueles longe dos grandes centros (GIUNTA & LACERDA, 2006).

A exigência de manutenção das Comissões de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH), Comissões Estaduais de Controle de Infecções Hospitalares (CECIH) e Comissões Municipais de Controle de Infecções Hospitalares (CMCIH) foi normalizada pelo Ministério da Saúde por meio da Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, que contextualiza a problemática das infecções também na dimensão do SUS, ao determinar as competências das três esferas de governo na sua prevenção (ANVISA, 2005).

As IRAS elevam as taxas de morbimortalidade, ampliam o tempo de permanência dos pacientes no hospital, o uso de drogas antimicrobianas e, conseqüentemente, aumentam os custos do tratamento e têm conseqüências irreparáveis, seja do ponto de vista humano, econômico ou social (EL FAL, MARINOS & MEDEIROS, 2001). Estima-se que a incidência mundial destas IRAS varie de 7 a 10 casos a cada 100 pacientes admitidos, e uma parcela significativa desta população está alocada nas UTIs (unidade de tratamento intensivo). Isso se deve a fatores de risco associados ao paciente, tipo de unidade hospitalar e instrumentos usados nestes setores (SMITH, 2006).

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

A ANVISA tem como principal função institucional a promoção e a proteção da saúde e isso envolve um grande leque de responsabilidades que abrange controles de ambientes relacionados ao paciente, controle de produtos e insumos que serão utilizados diretamente nesses ambientes com a finalidade de servir e contribuir para o restabelecimento dos pacientes (ANVISA, 2008).

As áreas hospitalares subdividem-se conforme os riscos em: (i) CRÍTICAS - são

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

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

Dentre os fatores que contribuem para a ocorrência de infecções hospitalares podemos ressaltar as transferências de genes de resistência bacteriana, o uso indiscriminado e irracional de agentes antimicrobianos, a limpeza e desinfecção inadequada das superfícies inanimadas e de materiais críticos e semicríticos.

## **Aspectos que influenciam a patogenicidade bacteriana**

### **Biofilmes bacterianos**

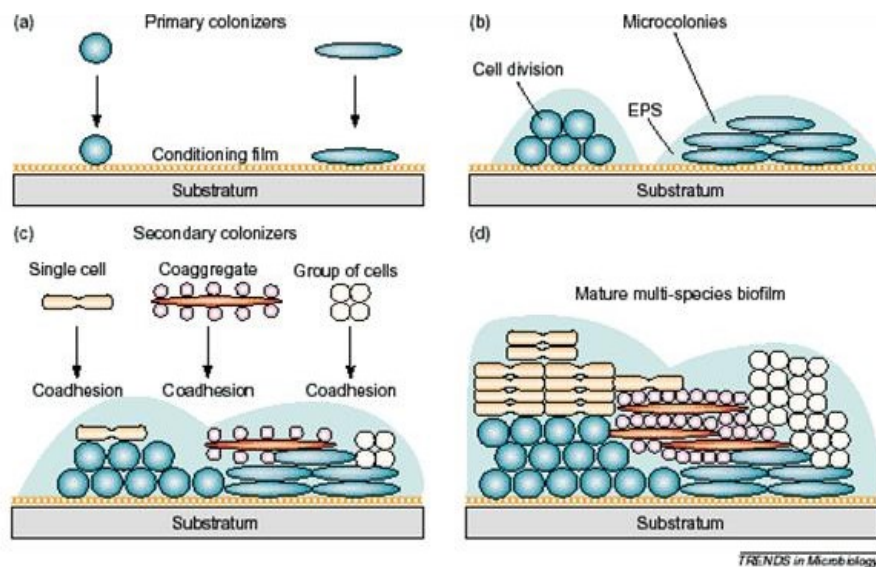
O biofilme pode ser definido como um conjunto de bactérias firmemente aderidas a uma superfície, englobado por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos produzidos pelas próprias bactérias. O biofilme bacteriano consiste em uma forma sésil e adaptativa no ciclo biológico das bactérias, com características genóticas e fenóticas distintas que o distingue das formas bacterianas livres e circulantes, denominadas de formas planctônicas. Estima-se que, aproximadamente 99% das bactérias da natureza em algum momento se apresentam sob a forma de biofilme. Analogamente, os biofilmes poderiam ser comparados aos recifes de corais e as bactérias planctônicas, aos plânctons do oceano (COSTERTON et al., 2003).

Os biofilmes podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. O ciclo biológico para a formação de um biofilme passa pelas etapas de contato, adesão, formação de pequenas colônias, maturação e dispersão, que dependem da influência do meio ambiente e das características genéticas das bactérias. A formação do biofilme é iniciada através das bactérias circulantes, que ao entrarem em contato com uma superfície, iniciam o processo de adesão formando pontes de ligação entre si e a superfície. À medida que a população em sua proximidade aumenta, as bactérias se organizam em microcolônias dispostas em monocamadas. Durante as etapas de contato, adesão e formação de pequenas colônias, cada bactéria passa a produzir moléculas sinalizadoras que, dependendo dos estímulos locais e principalmente da concentração atingida no microambiente, desencadeiam na ativação de genes específicos com a mudança do fenótipo de bactérias planctônicas para o fenótipo de biofilme, conforme ilustrado na Figura 1 (COSTERTON et al., 1995).

A formação de biofilmes está frequentemente associada à proteção contra possíveis agressões no ambiente. As modificações que ocorrem na forma de biofilme trazem inúmeras vantagens às bactérias. O envoltório extracelular as protege contra agressões físicas e químicas do meio externo, como a ação de raios ultravioleta e alterações do pH e de osmolaridade, além de reduzir significativamente a ação de mecanismos adaptativos e inatos

do sistema imunológico, como a ação de células fagocitárias, opsonização de anticorpos. Neste processo, as proteínas (opsoninas) ligam-se à superfície de bactérias ou a outros patógenos, facilitando o seu reconhecimento por receptores específicos presentes na superfície de fagócitos, favorecendo a digestão dos mesmos pelos neutrófilos, e atuando no sistema complemento (HOYLE; COSTERTON, 1991).

Figura 1 - Desenvolvimento de um biofilme



Legenda: (a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) co-adesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro.

Nota: Adaptada de RICKARD et al., TrendsMicrobiol.11:94-100, 2003.

Fonte: O autor, 2021.

A produção de biofilme pelos microrganismos ocorre preferencialmente em superfícies inertes, como dispositivos médicos, mas pode também ocorrer em tecidos vivos, como ocorre em infecções invasivas. O tratamento bem sucedido, nestes casos, em longo prazo, depende de doses elevadas de antibióticos e a remoção de qualquer corpo estranho (COSTERTON et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; MOHAMED et al., 2004, FUX et al., 2005, SOUSA et al., 2011). Por outro lado, tem sido demonstrado que a ação de antimicrobiano sobre os

biofilmes se torna extremamente reduzida em função de mecanismos de inativação exercidos pela matriz extracelular, da dificuldade de penetração no interior dos biofilmes e alteração na taxa de metabolismo das bactérias em seu interior, desta forma, bactérias em um biofilme encontram-se abrigadas e em relativa homeostase, graças à presença da substância polimérica extracelular. A substância polimérica extracelular (SPE) contém vários componentes: polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros, ela é secretada para o meio externo, sendo de diferentes composições. Ao que parece, a SPE tem diferentes estruturas e funções, dependendo das comunidades e/ou condições ambientais. Uma de suas funções é impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente. Em alguns casos a SPE é capaz de sequestrar cátions, metais e toxinas. Por estas razões, o biofilme é um fator imprescindível para a bactéria no que tange a proteção a agentes externos, e ainda favorece a transferência de genes de resistência entre microrganismos da mesma espécie ou até de espécies diferentes (CERI et al., 2001; ROSSI et al., 2017).

Outro aspecto que vem sendo analisado por diferentes pesquisadores é a capacidade de transferência genes de resistência observada para patógenos formadores de biofilme que apresentam componentes genéticos extracromossomiais (plasmídeos e transposons) através de mecanismo de conjugação. Estudos anteriores reportaram que a formação de biofilmes bacterianos é capaz de favorecer a resistência a diversos agentes desinfetantes e antibióticos utilizados em ambientes de assistência à saúde e também à radiação ultravioleta (ELARSI; MILLER, 1999). As células sésseis contidas em biofilmes são mais resistentes aos antibióticos comparadas com as células em seu estado planctônico (CERI et al., 2001). Diversos são os problemas causados pelos biofilmes, como: biocorrosão, comprometimento de dispositivos pertinentes em ambientes hospitalares, entre outros, tudo isso é acrescido ao potencial de resistência cruzada aos agentes químicos antimicrobianos (SIMÕES et al., 2003).

Infecções associadas a biofilmes geralmente são de natureza recorrente, visto que as terapias antimicrobianas convencionais eliminam predominantemente as formas planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento. Para tornar o quadro ainda mais grave, as bactérias presentes nos biofilmes encontram-se mais protegidas contra o sistema imune do hospedeiro. Exemplos típicos de doenças associadas a biofilmes incluem as infecções de implantes tais como válvulas cardíacas, cateteres, lentes de contato, dentre outros (MOHAMED et al., 2004).

Os biofilmes podem ainda promover doenças se formados em tecidos, tais como nas infecções pulmonares, periodontite e outras que colonizam uma grande parte das superfícies

direta ou indiretamente, sendo então capaz de invadir as células das mucosas e liberar toxinas (MILLER, 1999).

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

A adesão primária de bactérias planctônicas é um passo crucial na formação de biofilme. Na fase inicial, a aderência microbiana reversível é principalmente dependente das características da superfície da célula bacteriana e de parâmetros ambientais, tais como a natureza da superfície do material, a disponibilidade de substratos e nutrientes (STANLEY; LAZAZZERA, 2004).

Em ambientes naturais, as bactérias aderem principalmente à camada de moléculas adsorvidas, que reveste as superfícies inertes, a "película de condicionamento", assim chamada, e não diretamente ao substrato. *In vivo*, qualquer superfície de material é rapidamente coberta por plasma e proteínas de matriz para a qual as bactérias podem expressar adesinas específicas (ARCIOLA et al., 2005). A estimulação da formação de biofilme bacteriano por proteínas exógenas de mamíferos tem sido relatada em muitos patógenos humanos (BONIFAIT et al., 2008).

### **Produção de biofilme por corinebactérias**

A adesão microbiana e a formação de biofilme representam um importante problema de Saúde Pública. Mais de 60% das infecções bacterianas tratadas pelos clínicos são consideradas com envolvimento de espécies formadoras de biofilme. Nas últimas duas décadas o interesse no estudo de biofilmes tem ganhado grande impulso após a demonstração da relação causal entre inúmeras doenças infecciosas crônicas e hospitalares associando a infecções relacionadas a dispositivos invasivos e redicivantes e a presença de biofilmes bacterianos (COSTERTON, 1999). Mesmo em indivíduos com excelentes reações imunes celulares e humorais, essas infecções são raramente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Tomando em

consideração o envelhecimento da população e o número cada vez maior de dispositivos médicos implantáveis, espera-se o aumento do número de infecções causadas por patógenos oportunistas associadas a biofilmes (STEWART; COSTERTON, 2001; SOUSA et al., 2011).

Para algumas espécies de corinebactérias já foram descritas propriedades adesivas em superfícies bióticas e abióticas e de produção de biofilme, incluindo *C. jeikeium*, *Corynebacterium macginleyi* e *C. diphtheriae* (WANG et al., 2001A; KWASZEWSKA et al., 2006, SUZUKI et al., 2007, SANGAL et al., 2015). Estudos iniciais sobre a adesão a superfícies abióticas e formação de biofilme por *C. pseudodiphtheriticum* foram realizados em nosso laboratório (SOUZA, 2013).

Amostras de *C. pseudodiphtheriticum* exibiram um padrão de aderência agregativa que foi previamente associada com a capacidade de invasão e sobrevivência intracelular de alguns agentes patogênicos humanos, incluindo *C. diphtheriae* (HIRATA JR et al., 2008) e *Escherichia coli* (PEREIRA et al., 2008).

É geralmente reconhecido que a patogênese da *E. coli* pode ser dividida em várias fases, incluindo a colonização, a aderência e a formação de biofilme. Aderência deste microrganismo pode ser mostrada e contar com vários fatores diferentes que em conjunto contribuem de várias formas para mostrar o fenótipo de aderência agregativa. Sugere-se uma correlação entre a capacidade de expressar as fimbrias AA (AAF) e a capacidade de formar biofilme (HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006, FUJIYAMA et al., 2008). Desde a década de 70, já tem sido demonstrada a presença de fimbrias em algumas espécies de corinebactérias incluindo *C. pseudodiphtheriticum* e *C. diphtheriae* (YANAGAWA; HONDA, 1976).

A aderência das bactérias à superfície biomateriais é uma consequência das interações físico-químicas ocorridas entre o microrganismo e o substrato durante o processo de adesão. Este processo de adesão compreendem as forças de van der Waals, ácido-base de Lewis, e as forças eletrostáticas (ROSENBERG, 1981). A presença de proteínas associadas à superfície bacteriana pode estar associada à adesão inicial e à hidrofobicidade de superfície celular (COSTERTON et al., 1999; EIFF VON et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; SOUSA et al., 2011). Em geral, as amostras produtoras de biofilme demonstram uma maior aderência a superfícies plásticas, em comparação com as amostras não produtoras de biofilme.

*C. diphtheriae* e espécies lipofílicas de corinebactérias isoladas de pele foram relacionadas com hidrofobicidade e a formação de biofilmes em superfícies sólidas (MATTOS- GUARALDI; FORMIGA, 1999; KWASZEWSKA et al., 2006). Semelhante a *C. diphtheriae*,

*C. urealyticum* e outras espécies bacterianas (ROSENBERG, 1981; MATTOS-



GUARALDI; FORMIGA, 1991; SORIANO et al., 2008), foi observada a aderência de *C. pseudodiphtheriticum* ao poliestireno atribuída às interações hidrofóbicas entre as células e a carga negativa da superfície do plástico. No entanto, as amostras clínicas de *C. pseudodiphtheriticum* parecem exibir diferenças na capacidade de produção de biofilmes em superfícies de poliestireno (SOUZA, 2013).

Após a etapa inicial de aderência à superfície do substrato, as bactérias se multiplicam formando microcolônias e se acumulam como agrupamentos de células em várias camadas, um passo que envolve a adesão intercelular e a síntese de moléculas de matriz extracelular, tais como proteínas e polissacarídeos. A formação de microcolônias é uma resposta coordenada e adaptativa que facilita o desenvolvimento continuado e dispersão do biofilme. O contínuo crescimento dos microrganismos no biofilme ocorre conduzindo à formação de densos agregados bacterianos incorporados à matriz exopolimérica rodeado por uma rede de canais, típicos de biofilmes maduros (O'TOOLE et al., 2000; WEBB et al., 2003). O biofilme maduro pode, então, ser submetido a um processo de distanciamento liberando bactérias planctônicas que podem, em seguida, colonizar outra região ou substrato para formar novas microcolônias (KARATAN; WATNICK, 2009).

As amostras de *C. pseudodiphtheriticum* foram evidenciadas como fortes produtoras de biofilme na superfície do vidro. Da mesma forma a amostra de *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 relacionada ao cateter (GOMES et al., 2009; SOUZA, 2013), a formação de microcolônias foi verificada por ambas amostras de *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700/Faringite e HHC1507/bacteremia em superfícies hidrofílicas (vidro) e hidrofóbicas (poliuretano). A aderência de *C. diphtheriae* a superfícies hidrofílicas de vidro foi atribuída à presença de moléculas de matriz extracelular, principalmente polissacarídeos com níveis elevados de resíduos de ácido siálico (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1991; GOMES et al., 2009). O número de bactérias viáveis e a espécie do microrganismo, a superfície a que ele está exposto, as substâncias que estão associadas à superfície e aos microrganismos, são alguns dos muitos fatores que podem influenciar na formação de biofilme. Os poliuretanos são normalmente usados em várias aplicações médicas, incluindo cateteres e tubos para fins gerais, de cama hospitalar, lençóis cirúrgicos e curativos (DONLAN; COSTERTON, 2002; DONLAN, 2008). Geralmente são encontrados estudos na literatura que indicam que o aumento da síntese de exopolissacarídeo está muitas vezes relacionado com espécies bacterianas produtoras de

biofilme em cateteres associados com infecções sintomáticas (OLSON et al., 2002).

Uma grande quantidade de material de biofilme exibindo microcolônias bacterianas e

material amorfo foi observado na superfície e interior do cateter de poliuretano infectado *in vitro* com *C. pseudodiphtheriticum*. Assim como *C. diphtheriae* e outros agentes patogênicos Gram-positivos (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; GOMES et al., 2009), a aderência de *C. pseudodiphtheriticum* a poliuretano pode ser parcialmente explicada pelas cargas positivas associados com este polímero. A substância amorfa depositada ou glicocálice observada circundante às microcolônias de *C. pseudodiphtheriticum* nas superfícies do cateter de poliuretano reforça o fato de que as bactérias podem produzir ou atrair componentes poliméricos que fortalecem a sua ligação com superfícies abióticas *in vitro*. Além disso, a substância amorfa foi observada na superfície externa de cateteres de poliuretano infectados *in vitro* com *C. pseudodiphtheriticum*. Os dados sugerem que a espécie *C. pseudodiphtheriticum*, como outros agentes patogênicos, a partir de fontes exógenas ou endógenas, podem invadir através de uma ferida na inserção do cateter e migrarem ao longo da superfície externa do cateter e eventualmente colonizar o segmento de cateter (FRANSON et al., 1984).

### **Multirresistência de *Corynebacterium* spp. aos agentes antimicrobianos**

O aumento da resistência bacteriana aos diversos agentes antimicrobianos utilizados na clínica constitui um problema de Saúde Pública mundial que desperta a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/USA), a ANVISA, além de CCIH de diversas instituições de saúde (OLIVEIRA et al., 2009).

Diversos estudos têm mostrado o aumento na taxa de resistência aos antimicrobianos entre as espécies de *Corynebacterium*. Resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina e gentamicina tem sido relatada, levando algumas vezes ao uso de vancomicina como droga de escolha. Até o momento, vancomicina, teicoplanina e linezolida são os agentes mais efetivos *in vitro* contra corinebactérias (YOON et al., 2011; REDDY et al, 2012; MARTINS, 2014; WANG et al, 2019).

Dentre as principais espécies de *Corynebacterium* de relevância clínica, podem ser ressaltados os clones multirresistentes de *C. jeikeium*, *C. amycolatum* e *C. urealyticum* (RENOM et al., 2007). Recentemente, tem sido observado o aumento na resistência aos antimicrobianos entre as espécies *Corynebacterium minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. afermentans*, *C. macginleyi* e *C. striatum*, além de variações geográficas na frequência de

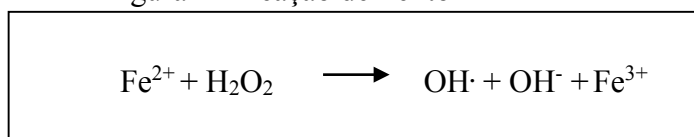
isolamento e na resistência natural e adquirida por tais espécies bacterianas (BELMARES et al., 2007; MARTINS et al., 2009; REDDY et al., 2012; RAMOS et al., 2018; NUDEL et al., 2018).

### **Influência de fatores ambientais sobre a patogenicidade bacteriana**

O conhecimento das condições ambientais que regulam a virulência é um passo essencial na compreensão das estratégias que os microrganismos adotam para se tornarem patógenos de sucesso, incluindo as corinebactérias (MEKALANOS, 1992; MOREIRA et al., 2003).

Naturalmente, livres na natureza, ou enquanto agentes infecciosos, em um organismo hospedeiro, os microrganismos lidam com diferentes condições, favoráveis ou adversas, que os leva a se modificarem fenotipicamente, através da expressão gênica condicionada a cada situação. Essa expressão, entre muitas outras coisas, pode ser alterada pelo estresse oxidativo, que é caracterizado pelo efeito das condições adversas relacionado à remoção de elétrons moleculares, tornando as moléculas instáveis e reativas. Essa condição molecular pode ser induzida, entre outras coisas, por metais como  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Co}^{2+}$  que participam das reações chamadas: Fenton e Fenton-like gerando moléculas conhecidas como espécies reativas de oxigênio (SANTOS, 2009)

Figura 2 - Reação de Fenton



Fonte: Santos, 2009

A limitação de ferro pode fazer com que patógenos bacterianos cresçam mais lentamente, entretanto, também pode estimular esses microrganismos a produzir maior dano tecidual, dado que diversos fatores de virulência são regulados, direta ou indiretamente, pelo suprimento de ferro no ambiente (TRIVIER e COURCOL, 1996; MOREIRA et al., 2003; SCHMIDT et al., 2018).

A expressão de fatores de aderência de diversas espécies é influenciada pelo suprimento de ferro no ambiente. A restrição de ferro no meio de crescimento promove a

produção de “slime” por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, a produção de adesinas de ligação de mucinas (ligantes de mucina) por *Pseudomonas aeruginosa*, e hidrofobicidade e a aderência a células HEp-2 por *Vibrio parahaemolyticus* (DAI, LEE e WONG, 1992; DEIGHTON & BORLAND, 1993; SCHARFMAN et al., 1996).

A expressão de diferentes determinantes microbianos de virulência pode ser controlada coordenadamente por sistemas regulatórios comuns. O ferro exerce papel regulatório sobre as propriedades adesivas em bacilos da difteria e a baixa disponibilidade de ferro modula a expressão de porções de carboidratos de superfície de *C. diphtheriae*. Para *C. diphtheriae*, estudos apontam que a regulação da aderência e da produção de “slime” são parte de uma resposta global a condições ambientais de limitação de ferro que inclui a desrepressão de genes para a síntese de citotoxinas e sideróforos e para transporte de complexos Fe (III) - sideróforo (MOREIRA et al., 2003).

O ferro é um cofator extremamente versátil para a maioria das reações bioquímicas tanto para os microrganismos quanto para seus hospedeiros. Apesar de ser o metal de transição mais abundante no corpo humano, sua disponibilidade é muito limitada, sendo inteiramente complexado com metaloproteínas ou glicoproteínas. Durante a infecção, a restrição de ferro é mais forte, pois a resposta do hospedeiro às bactérias invasoras inclui hipoferremia. Algumas espécies bacterianas são capazes de superar tal condição adversa no hospedeiro, em parte pela produção de sideróforos ou outro mecanismo de obtenção de ferro permitindo que elas expressem fatores de virulência tais como toxinas e enzimas (CAZA e KRONSTAD, 2013; SCHMIDT et al, 2018). Citotoxinas, sideróforos, heme oxigenase (HmuO) e lipoproteínas de superfície celular, em corinebactérias são reguladas tanto por ferro quanto pela proteína DtxR (MOREIRA et al., 2003).

Embora estudos tenham relatado papéis reguladores do ferro na patogênese da infecção de *C. diphtheriae*, estes são escassos e ainda se conhece muito pouco sobre os mecanismos envolvidos na conexão entre a disponibilidade de ferro e as propriedades adesivas em corinebactérias.

Estudos são necessários para avaliar a importância do ferro na evolução das infecções por corinebactérias tanto no processo de adesão inicial basal quanto nos processos mais complexos como os de disseminação, pois o ferro é um elemento presente em diversos ambientes e pode contribuir para favorecer infecções e surtos hospitalares.

### **Surto nosocomial e produção de biofilme por *C. striatum***

*C. striatum* é um patógeno que tem a capacidade de produzir surtos de infecções em ambientes nosocomiais (WANG et al., 2019). Em trabalho publicado por Baio e colaboradores (2013) foram descritas características fenotípicas e genotípicas de cepas (n=14) MDR e sensíveis de *C. striatum*, isoladas durante um surto em 2009, no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), Rio de Janeiro, Brasil. Posteriormente, outras cepas foram identificadas no próprio HUPE e no Hospital Municipal Jesus, revelando ainda outros pulsotipos MDR (RAMOS et al., 2019).

O patógeno foi isolado nos diversos setores dos hospitais, de diferentes sítios anatômicos, em indivíduos adultos. Metade do número de pacientes tinha 50 anos de idade ou mais. A maioria das cepas de *C. striatum* foi isolada de aspirados traqueais, de pacientes submetidos a procedimentos de intubação endotraqueal, e de sangue, em UTIs e enfermarias cirúrgicas.

Foi indicada por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE- Pulsed-Field Gel Electrophoresis) a presença de dez perfis clonais distintos (PFGE I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X) com a predominância do pulsotipo I entre as amostras. Os clones I e II foram isolados de secreção traqueal e aspirado traqueal, respectivamente. Os clones do tipo III e IV foram isolados de urina e secreção de feridas, respectivamente. Os clones V e VI isolados de sangue. Os clones VII e VIII foram isolados de cateter venoso central e de ponta de cateter, respectivamente. Os clones IX e X foram isolados de sangue e ponta de cateter, respectivamente. Os autores identificaram os perfis PFGE I, II, V, VI, VII, VIII e IX como sendo clones relacionados de cepas MDR, as quais apresentaram um perfil comum de sensibilidade à linezolida, vancomicina e tetraciclina. Os perfis PFGE III, IV e X de *C. striatum* foram identificados como sendo clones sensíveis às drogas.

Souza e colaboradores (2015) avaliaram fatores que corroboram para a persistência de cepas de *C. striatum* oriundas de surto nosocomial no HUPE, investigando a capacidade de formação de biofilme, *in vitro*, por cepas representativas dos quatro perfis clonais então identificados. Os resultados apontaram para habilidade de aderir a substratos diversos, incluindo vidro, poliestireno, poliuretano e metal. A habilidade em produzir biofilme foi verificada em todos os materiais, porém com intensidades distintas entre os pulsotipos, sendo o tipo I (MDR) o que mais produziu biofilme em todos os substratos testados e as amostras

MDS, amostras BR1961 e BR1954 as que apresentaram menor produção de biofilme.

O biofilme formado poderia favorecer o surgimento de cepas com fenótipo MDR, pois dificultaria a ação dos antibióticos utilizados rotineiramente sobre os microrganismos, o que permitiria o estabelecimento e disseminação da infecção nosocomial, principalmente nos pacientes fazendo uso de dispositivos médicos invasivos.

Adicionalmente foi verificado que algumas proteínas séricas (soroalbumina, fibrinogênio e fibrina) poderiam favorecer o aumento da produção de biofilme pelas cepas estudadas, sugerindo que fatores externos, como a presença de matéria orgânica e outros resíduos biológicos, facilmente encontrados nos ambientes nosocomiais, podem contribuir para produção de biofilme por *C. striatum*.

Estudos testando outros componentes para aferir sua influência sobre a produção de biofilme se fazem necessários, uma vez que tal fator de patogenicidade vem se destacando em importância para a viabilidade e manutenção de *C. striatum* em ambientes de assistência à saúde.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar a influência da disponibilidade de ferro na patogenicidade de *C. striatum* através da análise da sobrevivência, perfis resistência a agentes antimicrobianos e de formação de biofilme em superfícies abióticas diversas de amostras clínicas pertencentes a diferentes pulsotipos (PFGE - I a X).

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Investigar os perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos utilizados na terapia das infecções causadas por microrganismos Gram-positivos;
- b) Pesquisar a influência de condições de limitação e suplementação de ferro nos níveis de susceptibilidade bacteriana a diversos agentes antimicrobianos;
- c) Avaliar qualitativa e quantitativamente a capacidade de produção de biofilme em superfícies abióticas diversas, incluindo cateter de poliuretano;
- d) Analisar a influência de diferentes concentrações de ferro na capacidade de interação com superfícies abióticas e produção de biofilme em superfícies abióticas de natureza hidrofílica: vidro e poliuretano;
- e) Investigar a influência de ferro na capacidade de aderência, produção de biofilme e sobrevivência em superfície abiótica de natureza hidrofóbica: poliestireno;
- f) Investigar a capacidade de sobrevivência e a plasticidade morfológica de formas bacterianas planctônicas e sésseis (poliestireno) sob condições de estresse decorrentes da limitação de suprimento ferro;
- g) Determinar capacidade de produção de matriz extracelular durante a formação de biofilme no poliestireno pelas amostras em diferentes concentrações de ferro;
- h) Analisar preliminarmente pelo método de coloração com Comassie Blue e

Safranina a composição química de natureza proteica e polissacarídica, respectivamente, das superfícies celulares de formas sésseis e da matriz extracelular de biofilmes formados em diferentes concentrações de ferro;

- i) Analisar a morfologia de formas bacterianas sésseis e de biofilmes maduros produzidos em diferentes concentrações de ferro utilizando microscopia eletrônica de varredura.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Origem, identificação e estocagem das amostras bacterianas

No presente estudo, foram utilizadas dez amostras de *C. striatum*, parcialmente estudadas e previamente isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto - HUPE/UERJ (n=9) e no Hospital Municipal Jesus (n=1), localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil (Tabela 1).

As amostras de *C. striatum* foram previamente identificadas por métodos bioquímicos convencionais, espectrometria de massa (MALDI-TOF) e confirmadas pelas técnicas de sequenciamento dos genes 16S rRNA e rpoB. Adicionalmente, as amostras foram submetidas à análise genética por eletroforese de campo pulsado (PFGE) e classificadas em pulsotipos diversos (pulsotipos I a X) (BAIO et al. 2013; RAMOS et al, 2019). Conforme demonstrado na Tabela 1, foram utilizadas na presente investigação amostras de *C. striatum* representantes de cada um dos pulsotipos isoladas de pacientes que apresentaram quadro de infecção durante (n=4; PFGE-I a IV) e após o surto nosocomial (n=6, PFGE-V a X) ocorrido durante o período de Agosto/2009 a Abril/2010.

Os microrganismos foram obtidos da Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica – LDCIC – Disciplina de Microbiologia e Imunologia – FCM/UERJ onde são mantidos estocados em Skim milk (Oxoid™) a -70°C.

Tabela 1 - Origem das amostras de *Corynebacterium striatum* previamente isoladas de pacientes internados em unidades hospitalares localizadas na região metropolitana do Rio de Janeiro utilizadas no presente estudo

| Amostras (n=10) | PFGE | Hospital/ Ano                          | Setor hospitalar  | Idade   | Sexo | Sítio de isolamento    | Evolução clínica |
|-----------------|------|----------------------------------------|-------------------|---------|------|------------------------|------------------|
|                 |      | <i>HUPE - Durante surto nosocomial</i> |                   |         |      |                        |                  |
| 1987 BR-RJ      | I    | 2009                                   | Enfermaria 18     | 50 anos | F    | Lavado bronco-alveolar | Óbito            |
| 2369 BR-RJ      | II   | 2009                                   | UTI Geral         | -       | M    | Aspirado traqueal      | Cura             |
| 1961 BR-RJ      | III  | 2009                                   | DIP               | 37 anos | F    | Urina                  | -                |
| 1954 BR-RJ      | IV   | 2009                                   | Cirurgia torácica | -       | M    | Ferida cirúrgica       | -                |
|                 |      | <i>Pós-surto – HUPE</i>                |                   |         |      |                        |                  |
| 2103 BR-RJ      | VIII | 2010                                   | DIP               | -       | F    | Ponta de cateter       | -                |
| 2130 BR-RJ      | V    | 2010                                   | Dermatologia      | 30 anos | F    | Sangue                 | -                |
| 2237 BR-RJ      | VI   | 2011                                   | -                 | -       | -    | Sangue                 | -                |
| 2425 BR-RJ      | IX   | 2012                                   | Hematologia       | 10 anos | F    | Sangue                 | -                |
| 2376 BR-RJ      | X    | 2012                                   | UTI Neonatal      | 3 meses | F    | Ponta de cateter       | -                |
|                 |      | <i>HMJ</i>                             |                   |         |      |                        |                  |
| 2296 BR-RJ      | VII  | 2011                                   | -                 | -       | M    | Cateter venoso central | -                |

Legenda: PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado; *HUPE*: Hospital Universitário Pedro Ernesto; *HMJ*: Hospital Municipal Jesus; -: Não Informado; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; DIP: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Nota: Dados publicados previamente (BAIO *et al*, 2013 e RAMOS *et al*, 2019.) Fonte: O autor, 2021.

## 2.2. Testes de susceptibilidade e caracterização dos perfis de multirresistência aos agentes antimicrobianos

A avaliação dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão, conforme metodologia previamente descrita e segundo normas estabelecidas pelo CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute* (SOUZA, 2020; CLSI, 2018). Os ensaios foram realizados em meio MHA (Mueller-Hinton Ágar) suplementado com 5% de sangue de carneiro, sendo utilizados 21 agentes antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, UK) pertencentes a diferentes classes: penicilina (10U), ampicilina (30µg), meticilina (5µg),

cefotaxima (30µg), cefepime (30µg), ceftriaxona (30µg), imipenem (10µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), linezolida (30µg), ciprofloxacino (5µg), moxifloxacino (5µg), tetraciclina (30µg), gentamicina (10µg), rifampicina (5µg), fosfomicina (200µg), vancomicina (30µg), mupirocina (200µg), tobramicina (10µg), nitrofurantoína (300µg), ticarcilina/clavulanato (75µg/10µg).

As amostras de *C. striatum* foram consideradas multirresistentes (MDR) quando apresentaram resistência para agentes antimicrobianos pertencentes a três ou mais classes dos agentes antimicrobianos testados (MAGIORAKOS et al., 2012; SOUZA et al., 2020.).

### 2.3. Influência de concentrações ferro na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

Suspensões bacterianas foram cultivadas em 3,0 ml caldo TSB (Trypticase Soy Broth, Oxoid™) em condições de limitação e suplementação ferro a 37°/48 horas: (i) adição de alíquotas (5,0 µL) de solução de quelante 2,2'-dipyridyl a 400 mM (MOREIRA et al., 2003); (ii) suplementação de ferro pela adição de 1 g/L de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>), adaptado de metodologia anteriormente descrita (CATTONY et al., 2005). Posteriormente, as suspensões bacterianas foram centrifugadas, e os microrganismos foram submetidos a etapa de lavagem (três vezes) em solução salina tamponada e fosfatada (PBS; pH 7,2). Alíquotas de suspensões bacterianas em solução salina fisiológica em concentração correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foram preparadas para uso na análise dos perfis de sensibilidade aos agentes antimicrobianos das amostras de *C. striatum* pelo método disco-difusão em ágar, conforme descrito no item 2.2.

### 2.4. Interação bacteriana e produção de biofilme em superfícies abióticas

Para a realização dos ensaios qualitativos e quantitativos dos mecanismos de interação bacteriana e produção de biofilme em superfícies abióticas, as dez amostras de *C. striatum* pertencentes aos PFGE-tipos I a X foram inicialmente cultivadas em meio TSA (Trypticase Soy Agar, Oxoid™) a 37°C durante 48h. Suspensões bacterianas foram preparadas em meio TSB em concentrações correspondentes a densidade óptica de 0,2 a  $\lambda=580$  nm ( $\sim 5,0 \times 10^7$

UFC/mL) para a realização dos experimentos descritos a seguir.

#### 2.4.1. Aderência e produção de biofilme em cateter de poliuretano

##### 2.4.1.1. Técnica de rolamento (Maki-Teste)

A análise semiquantitativa da capacidade de aderência e produção de biofilme na superfície externa de cateter de poliuretano de quatro amostras de *C. striatum* foi realizada utilizando metodologia previamente descrita (MAKI et al., 1977; SOUZA et al., 2015). Segmentos estéreis de cateteres de poliuretano (5 cm) foram introduzidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio TSB e inoculados com alíquotas (100 µL) das suspensões ( $\sim 5,0 \times 10^7$  UFC/ml) de cada amostra de *C. striatum*. Após incubação a 37°C durante 48 horas e lavagem com PBS (pH 7,2) os segmentos de cateteres foram retirados dos tubos e submetidos ao rolamento na superfície de meio de ágar sangue com auxílio de pinça de metal. Os experimentos foram realizados em triplicata.

##### 2.4.1.2. Análise quantitativa da produção de biofilme em cateter de poliuretano

A análise quantitativa da viabilidade e da capacidade de aderência e produção de biofilme em superfícies internas e externas de cateteres de poliuretano de amostras de *C. striatum* foi realizada utilizando metodologia previamente descrita (BRUN-BRUISSON et al., 1987; DOOLEY et al., 1996; SOUZA et al., 2020). Após período de incubação de 48 h a 37°C, os fragmentos (0,5 cm) de cateteres presentes em tubos contendo 5 mL de meio TSB inoculados com 100 µL das suspensões bacterianas (D.O 0,2;  $\lambda=580$  nm), correspondentes às amostras testadas, foram lavados em PBS e formação de biofilme foi avaliada após extração por abrasão utilizando areia estéril (Vórtex multifuncional K40-1010, velocidade máxima por 1 minuto) e de contagem de células sésseis viáveis em meio TSA (UFC/mL).

#### 2.4.2. Pesquisa de aderência, viabilidade bacteriana e produção de biofilme na superfície de vidro

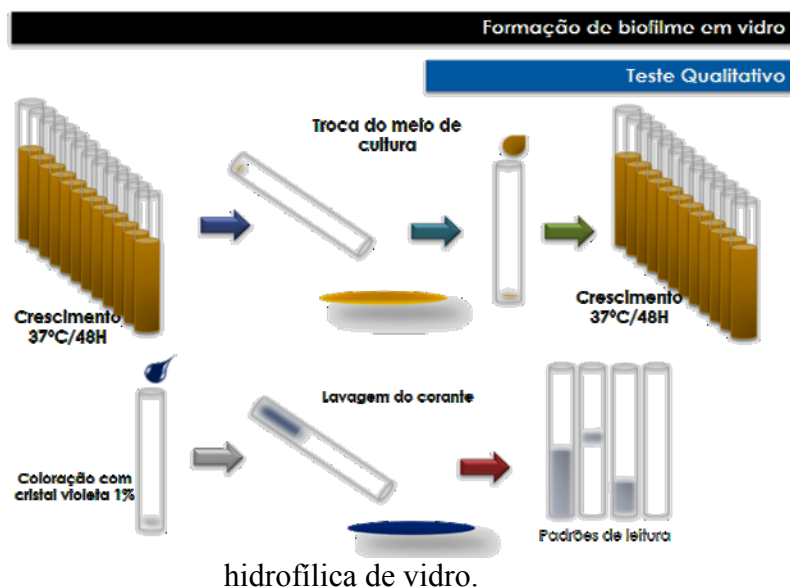
##### 2.4.2.1. Ensaios de aderência e produção de biofilme na superfície de tubos de vidro

Os experimentos utilizados na avaliação qualitativa e semi-quantitativa da capacidade de aderência e de produção de biofilme de amostras de *C. striatum* foram realizados utilizando metodologia previamente descrita, seguindo o seguinte critério de classificação: I – Forte: bactérias aderidas nas laterais e no fundo do tubo de vidro e na interface do meio de cultura e o ar; II – Moderado: bactérias aderidas nas laterais e no fundo do tubo de vidro; III – Fraco: bactérias aderidas ao vidro formando um anel na interface do meio de cultura e o ar; e IV – Negativo: ausência de bactérias aderidas na superfície do tubo de vidro (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991). Foram utilizados tubos de ensaio (15x100 mm) contendo 6 mL de meio TSB, inoculados com amostras de *C. striatum* em concentrações correspondentes a  $\sim 5,0 \times 10^7$  UFC/mL e incubados a 37°C durante 48 h. Em seguida, os meios de cultura foram retirados dos tubos para remoção das células bacterianas não aderentes a superfície do vidro e 6 mL de meio de TSB estéril foram adicionados aos tubos e reincubados por mais 48 h. Esse processo foi repetido duas vezes. Após o terceiro descarte do meio de cultura, os tubos foram gentilmente lavados com PBS pH 7,2, colocados para secar a 37°C durante uma noite (16 h) e corados por 5 minutos com solução de cristal violeta a 2% (Figura 3).

##### 2.4.2.2. Ensaios de produção de biofilme em lamínulas de vidro

Análises quantitativas de produção de biofilme e de viabilidade de formas sésseis de amostras de *C. striatum* foram realizadas em lamínulas redondas (13 mm) de vidro e processadas conforme descrito no item anterior - 2.4.1.1. A técnica de abrasão utilizando areia foi usada para a extração das formas sésseis e o meio TSA para determinação de bactérias viáveis - UFC/mL (BRUN-BUISSON et al., 1987; DOOLEY et al., 1996; SOUZA et al., 2020).

Figura 3 - Esquema simplificado da análise qualitativa e semiquantitativa da formação de biofilme em superfície



Nota: Técnica padronizada previamente (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991)

Fonte: O autor, 2021.

#### 2.4.3. Ensaio de aderência, viabilidade bacteriana e produção de biofilme em superfície de poliestireno

##### 2.4.3.1. Análise semi-quantitativa da produção de biofilme em poliestireno

Os experimentos foram realizados por técnica semi-quantitativa em microplacas de poliestireno com 96 poços (Cat. TCP 011096, Jetbiofil®, China- fundo chato) (GOMES et al., 2009; SOUZA et al., 2020). Para cada amostra de *C. striatum* testada, foram adicionados em cada poço das microplacas estéreis, alíquotas de 200 µL de suspensão bacteriana na concentração de  $\sim 5,0 \times 10^7$  UFC/mL preparadas em meio TSB. Após 48 h de incubação a 37°C, os poços foram lavados três vezes com PBS pH 7,2, e formas sésseis bacterianas que permaneceram aderidas na superfície do poliestireno foram fixadas com metanol (15 minutos) coradas com solução 2% de cristal violeta (5 minutos), ressuspensas em ácido acético para desprendimento das formas sésseis aderidas ao poliestireno e ajustadas em densidade óptica conforme estabelecido para análise microscópica em leitor de ELISA ( $\lambda=570$  nm).

Na avaliação da habilidade de aderência e de produção de biofilme em superfície de

poliestireno caracterizado como, material plástico de natureza hidrofóbica, as amostras de *C. striatum* foram classificadas nas seguintes categorias com base na densidade óptica (DO) das suspensões bacterianas: Negativas ( $0 < DO < DO_C$ ); Fracas (+:  $DO_C < DO \leq 2 \times DO_C$ ); Moderadas (++ :  $2 \times DO_C < DO \leq 4 \times DO_C$ ); Fortes (+++:  $4 \times DO_C \leq DO$ ).  $DO_C$ , densidade óptica dos controles negativos (ausência de microrganismos).

#### 2.4.3.2. Ensaios quantitativos de formas sésseis viáveis em superfícies de poliestireno

Lamínulas de Thermanox® (13mm $\times$ ) foram depositadas em placas de cultivo celular de 24 poços e imersas em 500  $\mu$ l das suspensões bacterianas preparadas para a realização dos ensaios de formação de biofilme conforme descrito no item 2.4.1.2. A análise quantitativa de formas sésseis viáveis foi realizada pelo método de extração por abrasão (areia) e contagem de unidades formadoras de colônias cultivadas em meio TSA (BRUN-BUISSON et al., 1987; DOOLEY et al., 1996; SOUZA et al., 2019).

### 2.5. **Influência de concentrações ferro na viabilidade bacteriana, propriedades adesivas e de formação de biofilme em superfícies abióticas**

No presente estudo foram utilizadas: (i) suspensões bacterianas cultivadas em condições de limitação de ferro pela adição de 5,0  $\mu$ L de uma solução quelante 2,2'-dipyridyl a 400 mM em 3,0 mL de TSB (MOREIRA et al., 2003); (ii) suspensões bacterianas cultivadas em condições de suplementação de ferro pela adição de 1g/L de  $FeSO_4$  ao meio TSB (CATTONY et al., 2005); (iii) suspensões bacterianas cultivadas em meio TSB, sem adição de quelante ou  $FeSO_4$ .

#### 2.5.1. Ensaios de aderência e de formação de biofilme na superfície do vidro

Os ensaios de aderência e produção de biofilme na superfície de tubos de vidro das amostras de *C. striatum* submetidas a diferentes condições de cultivo foram realizados conforme os procedimentos descritos nos itens 2.4.2.

### 2.5.2 Ensaio de aderência e de formação de biofilme na superfície de plástico - poliestireno

Análise semi-quantitativa da produção de biofilme utilizando a microtécnica e ensaios quantitativos de formas sésseis viáveis em superfícies de poliestireno das amostras de *C. striatum* submetidas a diferentes condições de cultivo foram realizados conforme procedimentos descritos nos itens 2.4.3.

### 2.5.3. Análise morfo-tintorial e da composição química estrutural de biofilmes em superfície poliestireno

Os ensaios foram realizados sobre lamínulas de Thermanox® (13mm<sup>2</sup>) depositadas em placas de cultivo celular de 24 poços imersas na presença de 500 µl das suspensões bacterianas, incubadas a 37°C durante 48h, conforme descrito no item 2.4.3.2. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, as lamínulas foram lavadas com 500 µl de PBS por duas vezes, e submetidas à etapa de fixação do biofilme com 500 µL de metanol durante cinco minutos. Procedimento de coloração: Etapa 1: lamínula coberta com uma solução de Comassie Blue a 0,02% durante 15 minutos; Etapa 2: lamínula coberta com solução de Safranina a 0,1% por 5 minutos; Etapa 3: lamínula lavada com PBS; Etapa 4: lamínula fixada com EntellanTM (Merck) sobre uma lâmina de vidro, mantendo a superfície contendo o biofilme exposta ao ambiente; Etapa 5: Após 48 horas, os biofilmes formados nas lamínulas Thermanox® foram submetidos a análise em microscópio Axioplan 2 (Zeiss Oberkochen, Ge) (STEPANOVIC et al., 2007).

### 2.5.4. Técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A análise estrutural de formas sésseis e de biofilmes formados na superfície de lamínulas Thermanox® por amostras de *C. striatum* representativas de quatro pulsotipos isolados de pacientes internados em unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de Janeiro foi realizada pela técnica de MEV. Resumidamente, biofilmes formados nas lamínulas Thermanox® por amostras de *C. striatum* durante 48 horas foram lavados duas vezes com 1 mL de salina estéril, fixados em solução de glutaraldeído a 2,5%, pós-fixados com tetróxido de



ósio a 1% e desidratado em diferentes soluções de etanol. Posteriormente, os materiais foram submetidos ao ponto crítico com dióxido de carbono, cobertos com nanopartículas de ouro e examinados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310 com a colaboração do Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra (UEZO) (SOUZA et al., 2020).

#### 2.5.5. Experimentos de análise da influência de condições de limitação de ferro na divisão e morfologia bacteriana

Nas investigações com formas planctônicas, foram utilizadas suspensões bacterianas cultivadas em 3,0 ml adicionados de 5,0 µL de solução quelante 2,2'-dipyridyl a 400 mM e incubadas a 37°C por 48h. Posteriormente, as células bacterianas foram centrifugadas por 2 minutos a 13400 rpm, submetidas a etapa de lavagem com PBS estéril (3 vezes). Aliquotas (5 µL) de células bacterianas foram coradas pelo método de Gram e foram observadas ao microscópio Axioplan 2 (Zeiss Oberkochen). Adicionalmente, aliquotas (5 µL) de células bacterianas foram recultivadas em 3 mL de meio TSB puro, sem adição de quelante e incubadas a 37°C/48 h. Similarmente, as células bacterianas foram centrifugadas, submetidas a etapa de lavagem com PBS (3 vezes) e submetidas a técnica de coloração de Gram.

A análise da influência de condições de limitação de ferro na divisão e morfologia de formas sésseis foi realizada durante os ensaios de produção de biofilme na superfície de lamínulas de poliestireno (Thermanox®), conforme descrito nos itens 2.5.3 e 2.5.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1. Susceptibilidade de amostras de *C. striatum* aos agentes antimicrobianos

Os resultados da ação de 21 agentes antimicrobianos utilizados na presente investigação frente amostras de *C. striatum* representantes de diferentes perfis genotípicos (PFGE-I a X) isoladas de pacientes infectados durante e pós-surto nosocomial em unidade hospitalar localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro foram apresentados na Tabela 2.

Dentre as 10 amostras representantes de diferentes perfis genotípicos testadas, nenhuma amostra de *C. striatum* expressando resistência à vancomicina e linezolida foi observada. Em contraste, as amostras vancomicina e linezolida-sensíveis de *C. striatum* representantes dos perfis PFGE- I a X – amostras 1987BR-RJ/PFGE-I, 2369BR-RJ/PFGE-II, 2130BR-RJ/PFGE- V, 2296BR-RJ/PFGE-VII, 2103 BR-RJ/PFGE-VIII e 2425 BR-RJ/PFGE-IX – expressaram resistência à penicilina, ampicilina, meticilina, cefotaxima, cefepime, ceftriaxona, imipenem, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, tetraciclina, gentamicina, rifampicina, fosfomicina, mupirocina, tobramicina, nitrofurantoína e ticarcilina/clavulanato (Tabela 2).

Todas as amostras de *C. striatum* representantes dos diferentes perfis genotípicos (PFGE-I a X) isoladas de pacientes infectados durante e pós-surto nosocomial em unidade hospitalar localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro foram resistentes a pelo menos dois dos 21 agentes antimicrobianos testados pertencentes a diferentes classes. Deste modo, os dados demonstraram diferenças entre as amostras clínicas de *C. striatum* estudadas quanto à capacidade de sobrevivência na presença de agentes antimicrobianos diversos, conforme apresentado nas (Tabelas 1 e 2).

### 3.1.1. Perfis de multirresistência-MDR aos agentes antimicrobianos

A expressão de perfis de multirresistência (MDR) foi observada para amostras de *C. striatum* representantes de sete perfis genotípicos distintos: 1987BR-RJ/PFGE-I, 2369 BR-RJ/PFGE-II, 2130 BR-RJ/PFGE-V, 2237BR-RJ/PFGE-VI, 2296BR-RJ/PFGE-VII, 2103BR-

RJ/PFGE-VIII e 2425BR-RJ/PFGE-IX (Tabela 2). Deste modo, amostras de *C. striatum* pertencentes a maioria dos diferentes pulso-tipos expressando perfis MDR e apresentando susceptibilidade apenas para tetraciclina, linezolida e vancomicina foram capazes de causar diferentes tipos de infecção durante e pós-surto nosocomial, incluindo: amostra 1987BR- RJ/PFGE-I isolada de lavado bronco alveolar, 2369BR-RJ/PFGE-II de aspirado traqueal, 2103BR-RJ/PFGE-VIII de CVC, 2130BR-RJ/ PFGE-V 2237BR-RJ/PFGE-VI e 2425BR- RJ/PFGE-IX isoladas de sangue e 2296BR-RJ/PFGE-VII de ponta de cateter. Dentre as amostras de *C. striatum* caracterizadas como MDR, foi observada heterogeneidade quanto a susceptibilidade aos seguintes agentes antimicrobianos avaliados: cefotaxima, imipenem e rifampicina.

Interessantemente, as amostras MDR de *C. striatum* representantes de perfis genotípicos distintos expressaram resistência ao imipenem, exceto a amostra 2237BR/RJ/PFGE-VI: 11987BR-RJ/PFGE-I, 2369BR-RJ/PFGE-II, 2130BR-RJ/PFGE-V, 2237BR-RJ/PFGE-VI, 2296BR-RJ/PFGE-VII, 2103BR-RJ/PFGE-VIII e 2425/PFGE-IX (Tabelas 1 e 2).

Amostras de *C. striatum*, susceptíveis a maioria dos agentes antimicrobianos testados, também foram isoladas de pacientes com infecções nosocomiais: MDS-1961/PFGE-III, MDS- 1954/PFGE-/IV e MDS-2376/PFGE-X. Interessantemente, as amostras MDS-1961/PFGE-III e MDS-1954/PFGE-/IV, respectivamente isoladas de urina e ferida cirúrgica, apresentaram resistência apenas a fosfomicina, mupirocina e ticarcilina/clavulanato. A amostra MDS-2376 - PFGE-X (ponta de cateter) apresentou susceptibilidade ao maior número de agentes antimicrobianos (n=19), sendo a única a expressar resistência somente a ampicilina e tetraciclina. Em contraste ao observado para a amostra MDS-2376/PFGE-X, todas as sete amostras MDR foram fosfomicina-sensíveis: MDR-11987/PFGE-I, MDR-2369/PFGE-II, MDR- 2130/PFGE-V, MDR-2237/PFGE-VI, MDR-2296/PFGE-VII, MDR-2103/PFGE-VIII e MDR -2425/PFGE-IX (Tabelas 1 e 2).

3.1.2. Influência de condições de limitação de ferro na susceptibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos

Os resultados da análise da influência de condições de limitação de ferro na susceptibilidade aos diversos agentes antimicrobianos de nove amostras de *C. striatum* de origens diversas foram demonstrados na Tabela 4. Os dados demonstraram que todas as amostras de *C. striatum* apresentando formas celulares planctônicas foram capazes de sobreviver e multiplicar em condições de estresse do meio ambiente relacionado a limitação de ferro, em consequência da adição do quelante 2,2'-dipyridyl no meio de cultura.

Tabela 2 - Resultados dos testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (n=21) utilizando o método de disco-difusão de amostras de *Corynebacterium striatum* representantes de diferentes perfis genotípicos (PFGE-I a X) isoladas de pacientes infectados durante e pós-surto nosocomial

| Agentes antimicrobianos     | Amostras de <i>C. striatum</i> e PFGE-tipos /<br>Sitios de isolamento |                      |             |                     |           |            |             |                  |            |                  | Total<br>R |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------|---------------------|-----------|------------|-------------|------------------|------------|------------------|------------|
|                             | 1987<br>I                                                             | 2369<br>II           | 1961<br>III | 1954<br>IV          | 2130<br>V | 2237<br>VI | 2296<br>VII | 2103<br>VIII     | 2425<br>IX | 2376<br>X        |            |
|                             | Lavado<br>bronco<br>alveolar                                          | Aspirado<br>traqueal | Urina       | Ferida<br>cirúrgica | Sangue    | Sangue     | CVC*        | Ponta<br>cateter | Sangue     | Ponta<br>cateter |            |
| Penicilina                  | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | R          | R           | R                | R          | S                | 7          |
| Ampicilina                  | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | R          | R           | R                | R          | R                | 8          |
| Meticilina                  | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Cefotaxima                  | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | S          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Cefepime                    | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Ceftriaxona                 | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Imipenem                    | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | S          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Eritromicina                | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | R          | R           | R                | R          | S                | 7          |
| Clindamicina                | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | R          | R           | R                | R          | S                | 7          |
| Linezolida                  | S                                                                     | S                    | S           | S                   | S         | S          | S           | S                | S          | S                | 0          |
| Ciprofloxacina              | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | R          | R           | R                | R          | S                | 7          |
| Moxifloxacina               | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | R          | R           | R                | R          | S                | 7          |
| Tetraciclina                | S                                                                     | S                    | S           | S                   | S         | S          | S           | S                | S          | R                | 1          |
| Gentamicina                 | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | R          | R           | R                | R          | S                | 7          |
| Rifampicina                 | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | S          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Fosfomicina                 | R                                                                     | R                    | R           | R                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 8          |
| Vancomicina                 | S                                                                     | S                    | S           | S                   | S         | S          | S           | S                | S          | S                | 0          |
| Mupirocina                  | R                                                                     | R                    | R           | R                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 8          |
| Tobramicina                 | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Nitrofurantoína             | R                                                                     | R                    | S           | S                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 6          |
| Ticarcilina/<br>Clavulanato | R                                                                     | R                    | R           | R                   | R         | -          | R           | R                | R          | S                | 8          |
| Total R                     | 18                                                                    | 18                   | 3           | 3                   | 18        | 7          | 18          | 18               | 18         | 2                |            |
| Total S                     | 3                                                                     | 3                    | 18          | 18                  | 3         | 6          | 3           | 3                | 3          | 19               |            |

Legenda: CVC, Cateter venoso central; S, sensível; (R), resistente; -, Não testado.

Fonte: O autor, 2021

Tabela 3 - Perfis de Multirresistência – MDR e de Susceptibilidade – MDS de amostras de *Corynebacterium striatum* com diferentes perfis genotípicos (PFGE-I a X) e isoladas de pacientes infectados durante e pós-surto nosocomial

| Agentes Antimicrobianos<br>testados | Amostras de <i>C. striatum</i> e PFGE-tipos / Sitios de isolamento |            |           |            |             |              |            |             |            |           |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------|-----------|------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|-----------|
|                                     | 1987<br>I                                                          | 2369<br>II | 2130<br>V | 2237<br>VI | 2296<br>VII | 2103<br>VIII | 2425<br>IX | 1961<br>III | 1954<br>IV | 2376<br>X |
|                                     | Perfis de Multirresistência – MDR e de Susceptibilidade – MDS      |            |           |            |             |              |            |             |            |           |
|                                     | MDR                                                                | MDR        | MDR       | MDR        | MDR         | MDR          | MDR        | MDS         | MDS        | MDS       |
| Penicilina                          | R                                                                  | R          | R         | R          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Ampicilina                          | R                                                                  | R          | R         | R          | R           | R            | R          | S           | S          | R         |
| Meticilina                          | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Cefotaxima                          | R                                                                  | R          | R         | S          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Cefepime                            | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Ceftriaxona                         | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Imipenem                            | R                                                                  | R          | R         | S          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Eritromicina                        | R                                                                  | R          | R         | R          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Clindamicina                        | R                                                                  | R          | R         | R          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Linezolida                          | S                                                                  | S          | S         | S          | S           | S            | S          | S           | S          | S         |
| Ciprofloxacina                      | R                                                                  | R          | R         | R          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Moxifloxacina                       | R                                                                  | R          | R         | R          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Tetraciclina                        | S                                                                  | S          | S         | S          | S           | S            | S          | S           | S          | R         |
| Gentamicina                         | R                                                                  | R          | R         | R          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Rifampicina                         | R                                                                  | R          | R         | S          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Fosfomicina                         | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | R           | R          | S         |
| Vancomicina                         | S                                                                  | S          | S         | S          | S           | S            | S          | S           | S          | S         |
| Mupirocina                          | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | R           | R          | S         |
| Tobramicina                         | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Nitrofurantoína                     | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | S           | S          | S         |
| Ticarcilina/<br>Clavulanato         | R                                                                  | R          | R         | -          | R           | R            | R          | R           | R          | S         |

Legenda: - Não testados; S, Sensível; R, Resistente; MDR, multirresistente e MDS, multissensível aos 21 agentes antimicrobianos testados, conforme previamente realizado por Baio e colaboradores (2013) e Ramos e colaboradores (2019); R, resistente; S, sensível; -, não testado.

Fonte: O autor, 2021.

Os resultados indicaram que os pré-cultivos em condições de limitação de ferro exerceram influência nos mecanismos de resposta ao estresse ambiental, ocasionados pela presença de agentes antimicrobianos de todas as amostras de *C. striatum* testadas. Entretanto, foram observados diferentes efeitos para as amostras de *C. striatum* e nas atividades dos agentes antimicrobianos testados. Para todas as amostras pré-cultivadas em condições de limitação de ferro, os resultados dos testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos permaneceram inalterados para determinados agentes antimicrobianos. Os resultados de até dez antimicrobianos permaneceram inalterados conforme observado para as amostras MDR-2369/PFGE-II e MDR-2296/PFGE-VII, enquanto no mínimo três foram mantidos para a amostra MDS-2376/PFGE-X.

Pré-cultivos em condições de limitação de ferro exerceram influência nos mecanismos de defesa das amostras de *C. striatum* contra a atividade antimicrobiana dos seguintes fármacos: clindamicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, tetraciclina, rifampicina, fosfomicina, mupirocina, tobramicina e nitrofurantoína.

Cinco amostras de *C. striatum* caracterizadas como sensíveis para determinados agentes antimicrobianos, quando pré-cultivadas em meio sem adição de quelante, passaram a expressar resistência quando submetidas a condições de limitação de ferro: clindamicina, ciprofloxacina, tetraciclina, rifampicina, fosfomicina, mupirocina, tobramicina e nitrofurantoína.

Em contraste, oito amostras de *C. striatum* que se apresentaram resistentes para alguns agentes antimicrobianos quando pré-cultivadas em meio sem quelante, passaram a ser caracterizadas como sensíveis quando analisadas em condições de limitação de ferro para clindamicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, tetraciclina, rifampicina.

Dentre as sete amostras moxifloxacina-resistentes expressando perfis MDR, as amostras BR1987/I-MDR, BR2369/II-MDR, BR2130/V-MDR, BR2237/VI-MDR e BR2103/VIII-MDR tornaram-se moxifloxacina-sensíveis quando pré-cultivadas em condições de limitação de ferro e as amostras BR2296/VII-MDR e BR2425/IX-MDR permaneceram moxifloxacina-resistentes.

As amostras BR2130/V-MDR, BR2237/VI-MDR e BR2425/IX-MDR que antes eram sensíveis à tetraciclina se tornaram resistentes após 48 horas sob limitação de ferro, em contrapartida, a amostras BR2376/X se tornou sensível. As amostras BR2130/V-MDR, BR2296/VII-MDR, BR2425/IX-MDR que, em condições normais, são resistentes a rifampicina, sob limitação de ferro, se tornaram sensíveis. Em relação à nitrofurantoína, a

limitação de ferro tornou as amostras BR1954/IV e BR2376/X resistentes, e, em relação à clindamicina, a limitação de ferro, induziu as amostras BR1954/IV e BR2425/IX-MDR à resistência e a amostras BR2103/VIII-MDR à sensibilidade.

Condições de limitação de ferro tornaram as amostras BR2425/IX-MDR e BR2376/X, sensível e resistente à tobramicina, respectivamente e, também tornou as amostras BR2130/V-MDR e BR2376/X, sensível e resistente à ciprofloxacina, respectivamente. Em relação à fosfomicina e mupirocina, a limitação de ferro induziu resistência para a amostra BR2376/X.

Em contraste, as amostras de *C. striatum* pré-cultivadas tanto na presença quanto na ausência do quelante de ferro 2,2'-dipyridyl permaneceram incapazes de expressar mecanismos de resposta ao estresse em decorrência da ação dos agentes antimicrobianos linezolida e vancomicina. Todas as nove amostras de *C. striatum* testadas, expressando perfis MDR e MDS independente da expressão dos perfis MDR (n=7) e MDS (n=2), assim como dos tipos de perfis PFGE e dos sítios de isolamento, apresentaram-se vancomicina-sensível e linezolida-sensível.

### 3.1.3. Influência da suplementação de ferro na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

A influência de pré-cultivos sob as condições de limitação e suplementação de ferro na expressão dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das amostras clínicas de *C. striatum* (n=10) pertencentes a diferentes pulsotipos (PFGE-I a X) foram apresentados na Tabela 6.

Para todas as amostras pré-cultivadas em condições de suplementação de ferro, os resultados dos testes de susceptibilidade para linezolida e vancomicina permaneceram inalterados. Os resultados de até dez antimicrobianos permaneceram inalterados conforme observado para as amostras BR1987/I-MDR, MDR-2369/PFGE-II e BR1954/IV e MDR-2296/PFGE-VII, enquanto no mínimo quatro foram mantidos para a amostra MDS-2376/PFGE-X (Tabela 5).



Tabela 4 - Influência de condições de limitação de ferro nos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (n=11) de amostras de *Corynebacterium striatum* (PFGE-I a X) pré-cultivados na ausência e na presença de quelante 2,2'-dipyridyl (48 h)

| Agentes antimicrobianos | Amostras de <i>C. striatum</i> / PFGE-tipos |                   |                  |                   |                    |                     |                   |                   |                  | Número amostras<br>S→R /<br>R→S |
|-------------------------|---------------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------------------|
|                         | 1987<br>I<br>MDR                            | 2369<br>II<br>MDR | 2130<br>V<br>MDR | 2237<br>VI<br>MDR | 2296<br>VII<br>MDR | 2103<br>VIII<br>MDR | 2425<br>IX<br>MDR | 1954<br>IV<br>MDS | 2376<br>X<br>MDS |                                 |
| <b>Clindamicina</b>     | R                                           | R                 | R                | R                 | R                  | R→S                 | R                 | S→R               | S→R              | 2/1                             |
| <b>Linezolida</b>       | S                                           | S                 | S                | S                 | S                  | S                   | S                 | -                 | S                | 0                               |
| <b>Ciprofloxacina</b>   | R                                           | R                 | R→S              | R                 | R                  | R                   | R                 | -                 | S→R              | 1/1                             |
| <b>Moxifloxacina</b>    | R→S                                         | R→S               | R→S              | R→S               | R                  | R→S                 | R                 | S                 | S                | 0/5                             |
| <b>Tetraciclina</b>     | S                                           | S                 | S→R              | S→R               | S                  | S                   | S→R               | S                 | R→S              | 3/1                             |
| <b>Rifampicina</b>      | R                                           | R                 | R→S              | S                 | R→S                | R                   | R→S               | S                 | S→R              | 3/1                             |
| <b>Fosfomicina</b>      | R                                           | R                 | R                | -                 | R                  | R                   | R                 | R                 | S→R              | 1/0                             |
| <b>Vancomicina</b>      | S                                           | S                 | S                | S                 | S                  | S                   | S                 | S                 | S                | 0                               |
| <b>Mupirocina</b>       | -                                           | R                 | -                | -                 | R                  | R                   | R                 | R                 | S→R              | 1/0                             |
| <b>Tobramicina</b>      | -                                           | R                 | -                | -                 | R                  | -                   | R→S               | -                 | S→R              | 1/1                             |
| <b>Nitrofurantoína</b>  | -                                           | R                 | R                | -                 | R                  | R                   | R                 | S→R               | S→R              | 2/0                             |
| Número amostras         |                                             |                   |                  |                   |                    |                     |                   |                   | Total            | <b>14/10</b>                    |
| <b>S→R</b>              | <b>0</b>                                    | <b>0</b>          | <b>1</b>         | <b>1</b>          | <b>0</b>           | <b>0</b>            | <b>1</b>          | <b>2</b>          | <b>7</b>         | <b>12</b>                       |
| <b>R→S</b>              | <b>1</b>                                    | <b>1</b>          | <b>3</b>         | <b>1</b>          | <b>1</b>           | <b>2</b>            | <b>2</b>          | <b>0</b>          | <b>1</b>         | <b>12</b>                       |
| <b>Total R/S</b>        |                                             |                   |                  |                   |                    |                     |                   |                   |                  |                                 |
| Limitação ferro         | <b>4/4</b>                                  | <b>7/4</b>        | <b>4/5</b>       | <b>3/5</b>        | <b>7/4</b>         | <b>4/5</b>          | <b>7/4</b>        | <b>4/4</b>        | <b>7/4</b>       | <b>47/39</b>                    |
| Controle                | <b>5/3</b>                                  | <b>8/3</b>        | <b>6/3</b>       | <b>3/5</b>        | <b>8/3</b>         | <b>6/3</b>          | <b>8/3</b>        | <b>2/6</b>        | <b>1/10</b>      | <b>47/39</b>                    |

Legenda: - Não testados; S, Sensível; R, Resistente; MDR, multirresistente; MDS, multissensível aos agentes antimicrobianos testados; R→S, alteração de resistente para sensível; S→R, alteração de sensível para resistente, susceptibilidade não alterada para amostras pré-cultivadas em condições de suplementação de ferro.

Nota: Adaptado de Baio et al, 2013 e Ramos et al, 2019

Fonte: O autor, 2021.

Dentre as amostras MDR de *C. striatum*, cinco, originalmente resistentes moxifloxacina, tornaram-se sensíveis após 48 horas sob condições de suplementação de ferro: BR1987/I-MDR, MDR-2369/PFGE-II, BR2130/V-MDR, BR2237/VI-MDR e BR2103/VIII-MDR (Tabela 5). As amostras BR1961/III, BR1954/IV, BR2130/V-MDR, BR2237/VI-MDR e BR2103/VIII-MDR que antes eram sensíveis à tetraciclina se tornaram

resistentes após 48 horas sob suplementação de ferro, em contrapartida, a amostras BR2376/X se tornou tetraciclina- sensível (Tabela 5).

Em relação à rifampicina, a suplementação de ferro, alterou os perfis das amostras BR2130/V-MDR, BR2296/VII-MDR e BR2425/IX de resistente para sensível e o perfil da amostra BR2376/X de sensível para resistente. A suplementação de ferro induziu as amostras BR2103/VIII-MDR e BR2376/X à sensibilidade e resistência à clindamicina, respectivamente. Esta condição também induziu resistência nas amostras BR1961/III e BR2376/X em relação à nitrofurantoína. Para a tobramicina, a suplementação de ferro induziu nas amostras BR2425/IX e BR2376/X, sensibilidade e resistência, respectivamente.

Tabela 5 - Influência de condições de suplementação de ferro nos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (n=11) de amostras de *Corynebacterium striatum* (PFGE-I a X) pré-cultivados na ausência e na presença de sulfato ferroso (48 h)

| Agentes antimicrobianos       | Amostras de <i>C. striatum</i> / PFGE-tipos |                   |                    |                   |                  |                   |                    |                     |                   |                  | Total R/S    |
|-------------------------------|---------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------|
|                               | 1987<br>I<br>MDR                            | 2369<br>II<br>MDR | 1961<br>III<br>MDS | 1954<br>IV<br>MDS | 2130<br>V<br>MDR | 2237<br>VI<br>MDS | 2296<br>VII<br>MDR | 2103<br>VIII<br>MDR | 2425<br>IX<br>MDR | 2376<br>X<br>MDS |              |
| <b>Clindamicina</b>           | R                                           | R                 | S                  | S                 | R                | R                 | R                  | R→S                 | R                 | S→R              | 1/1          |
| Linezolida                    | S                                           | S                 | S                  | S                 | S                | S                 | S                  | S                   | S                 | S                | 0            |
| <b>Ciprofloxacina</b>         | R                                           | R                 | S                  | S                 | R                | R                 | R                  | R                   | R                 | S→R              | 1/0          |
| <b>Moxifloxacina</b>          | R→S                                         | R→S               | S                  | S                 | R→S              | R→S               | R                  | R→S                 | R                 | S                | 0/5          |
| <b>Tetraciclina</b>           | S                                           | S                 | S→R                | S→R               | S→R              | S→R               | S                  | S→R                 | S                 | R→S              | 5/1          |
| <b>Rifampicina</b>            | R                                           | -                 | -                  | S                 | R→S              | S                 | R→S                | R                   | R→S               | S→R              | 3/1          |
| *Fosfomicina                  | R                                           | R                 | R                  | R                 | R                | -                 | R                  | R                   | R                 | S*               | 0            |
| Vancomicina                   | S                                           | S                 | S                  | S                 | S                | S                 | S                  | S                   | S                 | S                | 0            |
| <b>Mupirocina</b>             | R                                           | R                 | -                  | R                 | -                | -                 | R                  | R                   | R                 | S→R              | 1/0          |
| <b>Tobramicina</b>            | R                                           | R                 | -                  | -                 | -                | -                 | R                  | -                   | R→S               | S→R              | 1/1          |
| <b>Nitrofurantoína</b>        | R                                           | R                 | S→R                | -                 | R                | -                 | R                  | R                   | R                 | S→R              | 2/0          |
| Número amostras               |                                             |                   |                    |                   |                  |                   |                    |                     |                   | Total            | <b>14/8</b>  |
| <b>S→R</b>                    | <b>0</b>                                    | <b>0</b>          | <b>1</b>           | <b>1</b>          | <b>1</b>         | <b>1</b>          | <b>0</b>           | <b>1</b>            | <b>0</b>          | <b>6</b>         | <b>11</b>    |
| <b>R→S</b>                    | <b>1</b>                                    | <b>1</b>          | <b>0</b>           | <b>0</b>          | <b>2</b>         | <b>1</b>          | <b>1</b>           | <b>2</b>            | <b>2</b>          | <b>1</b>         | <b>11</b>    |
| Total R/S Suplementação ferro | <b>7/4</b>                                  | <b>6/4</b>        | <b>3/5</b>         | <b>3/6</b>        | <b>5/3</b>       | <b>3/4</b>        | <b>7/4</b>         | <b>6/4</b>          | <b>6/4</b>        | <b>6/5</b>       | <b>52/43</b> |
| Controle                      | <b>8/3</b>                                  | <b>7/3</b>        | <b>1/7</b>         | <b>2/7</b>        | <b>5/3</b>       | <b>3/4</b>        | <b>8/3</b>         | <b>7/3</b>          | <b>8/2</b>        | <b>1/10</b>      | <b>50/45</b> |

Legenda: -, Não testado; S, Sensível; R, Resistente; MDR, multirresistente; MDS, Multissensível aos agentes antimicrobianos testados; R→S, alteração de resistente para sensível; S→R, alteração de sensível para resistente; \*, S→R quando pré-cultivadas em condições de limitação de ferro.

Nota: Adaptado de BAIO *et al.*, (2013) e RAMOS *et al.*, (2019).

Fonte: O autor, 2021

Tabela 6 - Perfis de multirresistência – MDR e de susceptibilidade – MDS a agentes antimicrobianos de amostras clínicas de *Corynebacterium striatum* (n=10) pertencentes a diferentes pulsotipos (PFGE-I a X) pré-cultivadas sob condições de limitação e suplementação de ferro

| Condições de cultivo e expressão de Resistência - R e Susceptibilidade - S | Amostras de <i>C. striatum</i> / PFGE-tipos |            |             |            |           |            |             |              |            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------|-------------|------------|-----------|------------|-------------|--------------|------------|-----------|
|                                                                            | 1987<br>I                                   | 2369<br>II | 1961<br>III | 1954<br>IV | 2130<br>V | 2237<br>VI | 2296<br>VII | 2103<br>VIII | 2425<br>IX | 2376<br>X |
| Controle                                                                   | MDR                                         | MDR        | MDS         | MDS        | MDR       | MDR        | MDR         | MDR          | MDR        | MDS       |
| Limitação de ferro                                                         | MDR                                         | MDR        | —           | MDR        | MDR       | MDR        | MDR         | MDR          | MDR        | MDR       |
| Total: <b>R47 / S39</b>                                                    | 4/4                                         | 7/4        | —           | 4/4        | 4/5       | 3/5        | 7/4         | 4/5          | 7/4        | 7/4       |
| Controle: <b>R47 / S39</b>                                                 | 5/3                                         | 8/3        |             | 2/6        | 8/3       | 3/5        | 8/3         | 6/3          | 8/3        | 1/10      |
| Suplementação de ferro                                                     | MDR                                         | MDR        | MDR         | MDR        | MDR       | MDR        | MDR         | MDR          | MDR        | MDR       |
| Total: <b>R52 / S43</b>                                                    | 7/4                                         | 6/4        | 3/5         | 3/6        | 5/3       | 3/4        | 7/4         | 6/4          | 6/4        | 6/5       |
| Controle: <b>R50 / S45</b>                                                 | 8/3                                         | 7/3        | 1/7         | 2/7        | 5/3       | 3/4        | 8/3         | 7/3          | 8/2        | 1/10      |

Legenda: Não testado; R, Resistente; S, Sensível; MDR, multirresistente; MDS, multissensível aos agentes antimicrobianos testados; R→S, alteração de resistente para sensível; S→R, alteração de sensível para resistente. Controle, microrganismos pré-cultivados em caldo TSB (Trypticase Soy Broth, Oxoid™) sem adição de solução de quelante 2,2'-dipyridyl ou de FeSO<sub>4</sub>

Nota: Adaptado de BAIO *et al.*, (2013); RAMOS *et al.*, (2019)

Fonte: O autor, 2021

### 3.2. Interação bacteriana e produção de biofilme em superfícies abióticas

#### 3.2.1. Aderência e produção de biofilme em cateter de poliuretano

Na Figura 4 foram ilustrados os resultados dos ensaios de interação com segmentos de cateteres de poliuretano de amostras de *C. striatum*. A capacidade de formação de biofilme das amostras foi demonstrada pela formação de tapetes bacterianos em ágar sangue de carneiro (5%) a partir de células sésseis viáveis, originalmente aderidas na superfície de cateteres inoculados in vitro. A análise semiquantitativa da capacidade de aderência e produção de biofilme na superfície externa de cateter de poliuretano de quatro amostras de *C. striatum* pela técnica de Maki demonstrou que todas as amostras de *C. striatum* testadas apresentaram habilidade de formação de tapete bacteriano confluyente revelando propriedades adesivas à

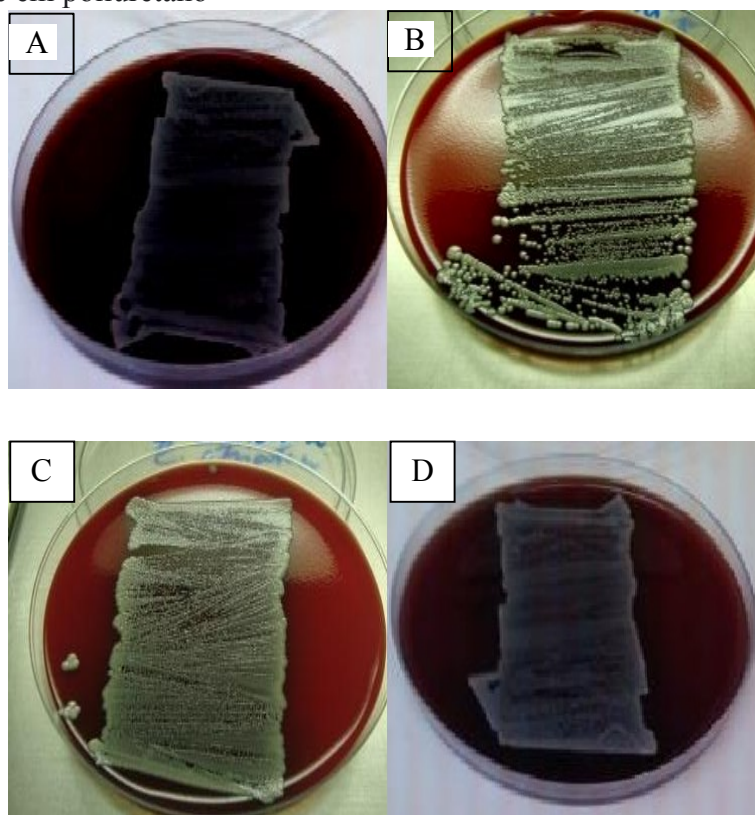
superfície hidrofílica de cateteres de poliuretano.

Os resultados da avaliação quantitativa da produção de biofilme no poliuretano foram apresentados na Figura 4. Todas as amostras expressaram a capacidade de produzir biofilme e permaneceram viáveis na superfície hidrofílica de segmentos de cateter de poliuretano após 48 horas de incubação. A maioria das amostras testadas apresentou viabilidade em intensidades similares ( $1,0 \times 10^7 \pm 1,23 \times 10^3$  UFC/ml), com exceção da amostra MDR-BR1987/I que apresentou contagem de viáveis significativamente mais elevada ( $8,65 \times 10^7 \pm 1,64 \times 10^2$  UFC/ml,  $P < 0,05$ ). A amostra MDR-BR2369/II apresentou a menor média de contagem de viáveis ( $1,12 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^3$  UFC/ml).

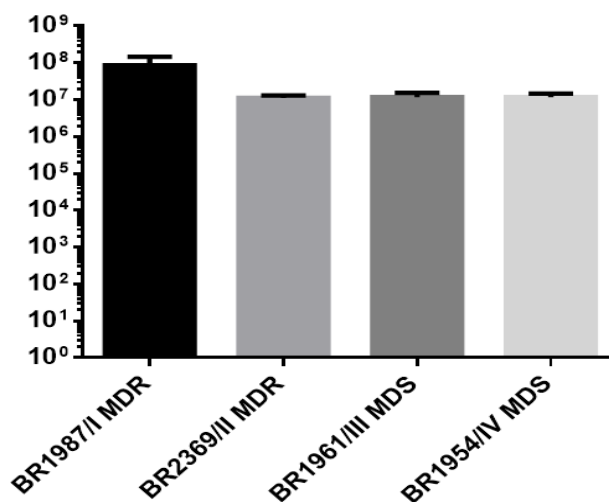
Deste modo, os dados demonstraram que as amostras de *C. striatum* expressaram capacidade de aderência, produção de biofilme e viabilidade de formas sésseis bacterianas, independente dos sítios de isolamento e dos perfis PFGE e de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Figura 4 - Biofilme em poliuretano

**I:  
Técnica  
de Maki**



**II:  
Bactérias  
sésseis  
viáveis  
(UFC/ml)**



Legenda: (I) Aderência, viabilidade de formas sésseis viáveis e de produção de biofilme na superfície de segmentos de cateteres de poliuretano (5 cm) de amostras de *Corynebacterium striatum*, Técnica de Maki e (II) Análise quantitativa de formas sésseis viáveis (UFC/ml). Amostras: A) MDR 1987 BR-RJ/PFGE-I, (B) MDS 1954 BR-RJ/PFGE-IV, (C) MDS 1961 BR-RJ/PFGE-III- e (D) MDR2369 BR-RJ/PFGE-II.

Fonte: O autor, 2021

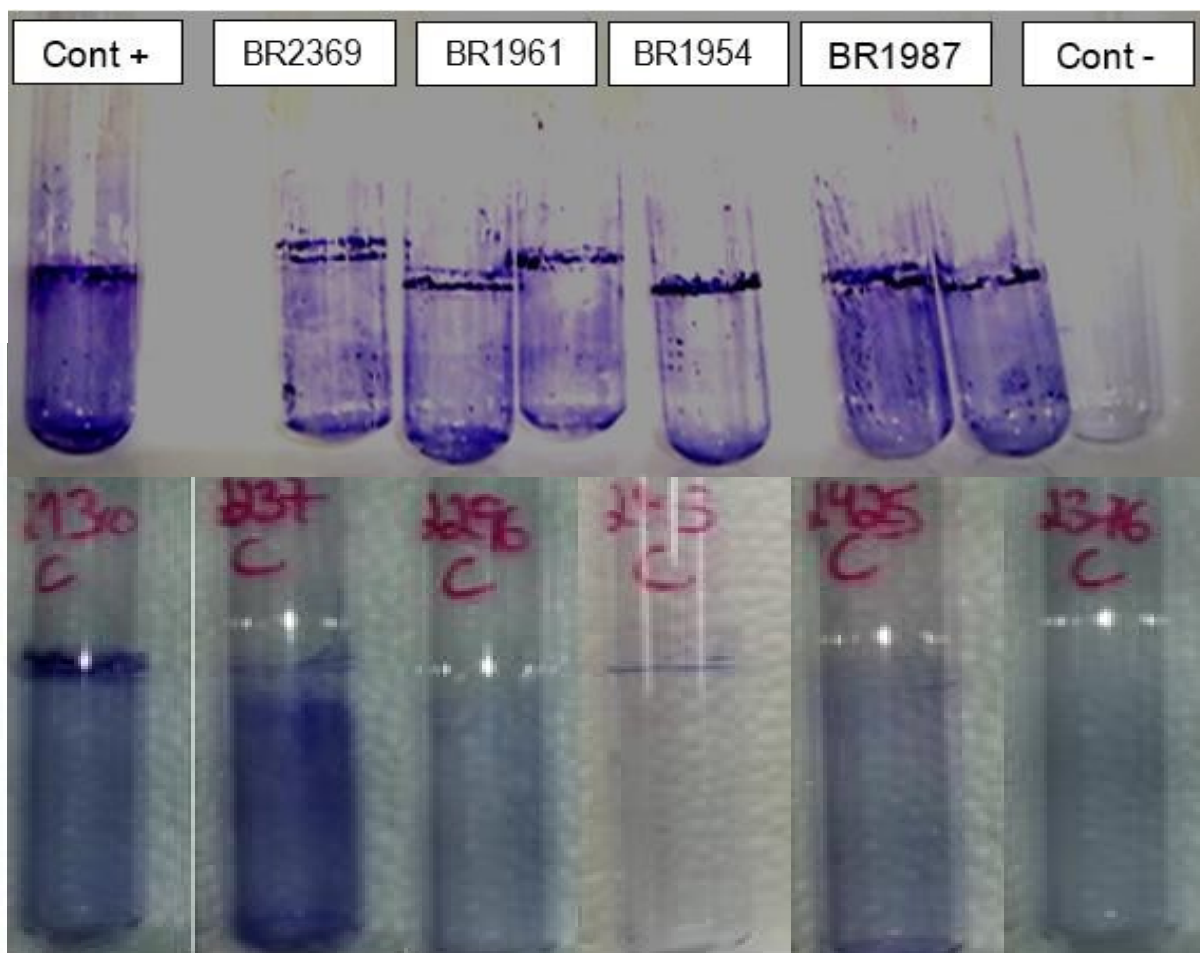
### 3.2.2. Propriedades adesivas, viabilidade bacteriana e produção de biofilme na superfície de vidro.

Os ensaios de avaliação qualitativa e semi-quantitativa da capacidade de aderência e de produção de biofilme de *C. striatum* na superfície de substrato abiótico de natureza hidrofílica demonstraram que a maioria (n=9) das amostras estudadas expressou propriedades adesivas e de formação de biofilme nas paredes de tubos de vidro, em intensidades variadas, conforme ilustrado na Figura 5. Uma única amostra MDR-negativa (2376/PFGE-X), previamente isolada de ponta de cateter de paciente de UTI Neonatal, demonstrou incapacidade de aderir do vidro e consequentemente formar biofilme na superfície desse substrato abiótico de natureza hidrofílica com carga positiva. As demais amostras de *C. striatum* apresentaram propriedades adesivas e de formação de biofilme nas paredes de tubos de vidro, caracterizadas como forte (n=4), moderada (n=3) e fraco (n=2), independente do sítios de isolamento, dos perfis PFGE e de resistência aos antimicrobianos (MDS/MDR): Perfil I forte (+++) MDR 2369BR-RJ/PFGE-II, MDS 1961BR-RJ/PFGE-III, MDR1987BR-RJ/PFGE-I e MDR 2130BR-RJ/PFGE-V; Perfil moderado (++) MDR 2237BR-RJ/PFGE-VI, MDR 2296BR-RJ/PFGE-VII, MDR 2425 BR-RJ/PFGE-IX; Perfil III fraco (+) MDR 1954BR-RJ/PFGE-IV e MDR 2103 BR-RJ/PFGE-VIII (Tabela 7).

Os resultados da análise quantitativa da viabilidade de quatro amostras de *C. striatum* aderidas à superfície do vidro demonstraram que as formas sésseis das amostras MDR e MDS foram capazes de permanecer viáveis na superfície hidrofílica de vidro, em intensidades variadas, conforme ilustrado na Figura 6.

As três amostras que revelaram padrão I de aderência ao vidro (MDR1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2369BR-RJ/PFGE-II, MDS 1961BR-RJ/PFGE-III) exibiram diferenças nos números de bactérias sésseis viáveis aderidas ao substrato. O maior número de células viáveis ( $2,93 \times 10^7 \pm 0,52 \times 10^4$  UFC/ml) aderido ao substrato hidrofílico abiótico de carga positiva testado foi observado para a amostra 1987BR-RJ expressando perfil MDR representativa do PFGE-tipo I, predominantemente observado durante e após o surto hospitalar. A amostra MDR 1954BR-RJ/PFGE-IV, com perfil III de aderência, apresentou contagens similar de bactérias viáveis aderidas às observadas para as amostras 1961BR-RJ/PFGE-III e MDR 2369BR-RJ/PFGE-II com perfil de aderência ao vidro tipo I. Deste modo, diferenças qualitativas e quantitativas na capacidade de aderir ao vidro foram observadas entre as amostras de *C. striatum* estudadas (Figura 5 e Tabela 7).

Figura 5 - Análise semi-quantitativa de capacidade de aderência e formação de biofilme em superfície hidrofílica abiótica de vidro de dez amostras de *Corynebacterium striatum* oriundas de surto nosocomial de hospitais



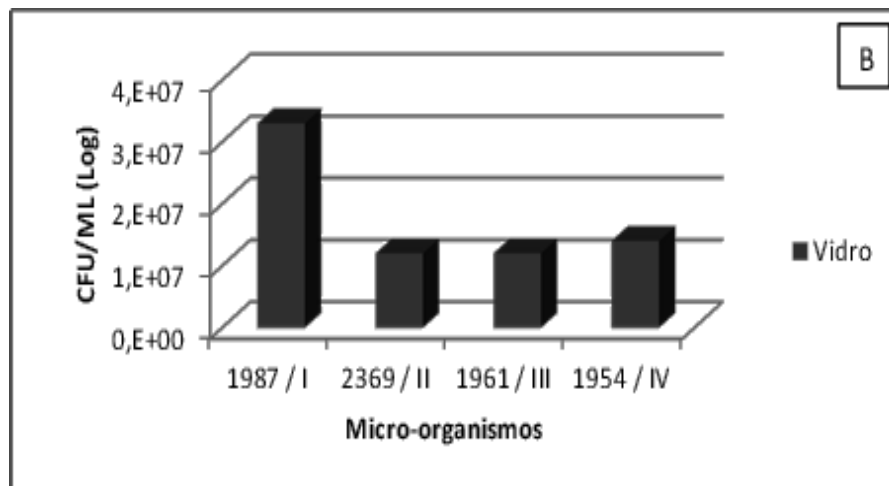
da região metropolitana do Rio de Janeiro

Legenda: Controle positivo a amostra de *Corynebacterium diphtheriae* BR-CAT5003. As amostras BR2369/II- MDR, BR1961/III, BR1987/I-MDR e BR2130/V-MDR apresentam perfil tipo I (forte); as amostras BR2237/VI-MDR, BR2296/VII-MDR e BR2425/IX apresentam perfil tipo II (moderado); as amostras BR1954/IV e BR2103/VIII-MDR apresenta perfil tipo III (fraco); e, a amostras BR2376/X apresentou perfil tipo IV (negativo). Controle negativo, meio TSB estéril.

Fonte: O autor, 2021



Figura 6 - Análise quantitativa da produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico de vidro de amostras *C. striatum* isoladas durante surto ocorrido em hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro.



Legenda: A amostra MDR 1987BR-RJ/PFGE-I apresentou maior número de formas sésseis viáveis.

Fonte: O autor, 2021

Tabela 7 - Propriedades adesivas, viabilidade de formas sésseis e produção de biofilme na superfície hidrofílica de vidro de amostras clínicas de *Corynebacterium striatum* previamente isoladas em unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de Janeiro\*

| Amostras/<br>Pulsotipos         | Setor<br>hospitalar    | Sítio de<br>isolamento     | Perfis de<br>Resistência aos<br>Antimicrobianos | Biofilme no vidro          |                                                             |
|---------------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                 |                        |                            |                                                 | Intensidade<br>/Perfil     | Viabilidade<br>Formas sésseis<br>(UFC x10 <sup>7</sup> /ml) |
| 1987 BR-RJ/<br><b>PFGE-I</b>    | Enfermaria             | Lavado Bronco-<br>Alveolar | <b>MDR</b>                                      | +++ / <b>I</b><br>Forte    | 2,93                                                        |
| 2369 BR-RJ/<br><b>PFGE-II</b>   | UTI Geral              | Aspirado<br>Traqueal       | <b>MDR</b>                                      | +++ / <b>I</b><br>Forte    | 0,97                                                        |
| 1961 BR-RJ/<br><b>PFGE-III</b>  | DIP                    | Urina                      | <b>MDS</b>                                      | +++ / <b>I</b><br>Forte    | 1,13                                                        |
| 1954 BR-RJ/<br><b>PFGE-IV</b>   | Cirurgia<br>Torácica   | Ferida<br>Cirúrgica        | <b>MDS</b>                                      | + / <b>III</b><br>Fraco    | 1,20                                                        |
| 2130 BR-RJ/<br><b>PFGE-V</b>    | Dermatologia           | Sangue                     | <b>MDR</b>                                      | +++ / <b>I</b><br>Forte    | ND                                                          |
| 2237 BR-RJ/<br><b>PFGE-VI</b>   | NI                     | Sangue                     | <b>MDR</b>                                      | ++ / <b>II</b><br>Moderado | ND                                                          |
| 2296 BR-RJ/<br><b>PFGE-VII</b>  | Hospital Jesus         | Cateter Venoso<br>Central  | <b>MDR</b>                                      | + / <b>III</b><br>Fraco    | ND                                                          |
| 2103 BR-RJ/<br><b>PFGE-VIII</b> | Doenças<br>Infecciosas | Ponta de Cateter           | <b>MDR</b>                                      | + / <b>III</b><br>Fraco    | ND                                                          |
| 2425 BR-RJ/<br><b>PFGE-IX</b>   | Hematologia            | Sangue                     | <b>MDR</b>                                      | ++ / <b>II</b><br>Moderado | ND                                                          |
| 2376 BR-RJ/<br><b>PFGE-X</b>    | UTI Neonatal           | Ponta de Cateter           | <b>MDS</b>                                      | - / <b>IV</b><br>Negativo  | ND                                                          |

Legenda: UTI, Unidade de Terapia Intensiva; Enf., Enfermaria; MDR, multirresistente (três ou mais classes de agentes antimicrobianos); MDS, resistentes < três classes de antimicrobianos S, sensível; NI, não informado; ND, Não determinado.

Nota: Adaptado de Baio *et al.* 2013; Ramos *et al.* 2019.

Fonte: O autor, 2021

### 3.2.2.1. Influência de diferentes concentrações ferro na aderência e produção de biofilme em superfícies hidrofílicas de vidro

Os dados obtidos nessa etapa do estudo indicaram que a disponibilidade de ferro no meio ambiente foi capaz de exercer influência na produção de biofilme em superfície hidrofílica de vidro de amostras de *C. striatum*, porém de formas e em intensidades variadas, conforme demonstrado nos itens descritos abaixo.

### 3.2.2.2. Influência de condições de limitação de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro.

Na Tabela 8 foram apresentados os resultados dos ensaios de formação de biofilme na ausência e na presença de quelante de ferro (2,2'-dipyridyl) das dez amostras, parcialmente estudadas, de *C. striatum* isoladas de hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro. A limitação de ferro exerceu atividade reguladora-negativa nos mecanismos de produção de biofilme em superfície hidrofílica de vidro para a maioria das amostras testadas, porém em intensidades variadas. Para o patógeno *C. striatum*, a condição de estresse decorrente da limitação de ferro exerceu atividade de regulação-positiva na expressão de perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e de regulação-negativa dos mecanismos de produção de biofilme no vidro para a maioria das amostras testadas, independente dos sítios de isolamento e da expressão dos perfis PFGE.

Cinco amostras MDR de *C. striatum* caracterizadas como fortemente (+++/perfil I) ou moderadamente (++/perfil II) produtoras de biofilme no vidro não expressaram propriedades adesivas e capacidade de produzir biofilme em condições de limitação de ferro na superfície desse tipo de substrato abiótico de natureza hidrofílica e carga positiva (-/perfil IV): 1987BR-RJ/PFGE-I, 2369BR-RJ/PFGE-II, 2130BR-RJ/PFGE-V, 2237BR-RJ/PFGE-VI, 2296BR-RJ/PFGE-VII.

A amostra de *C. striatum* 1961BR-RJ/PFGE-III que expressou perfil MDS e que foi previamente isolada de paciente com infecção urinária e caracterizada como fortemente produtora de biofilme no vidro (+++/perfil I), quando submetida aos ensaios realizados em condições de limitação de ferro permaneceu com a capacidade de aderir à superfície do vidro

e de produzir biofilme, porém em menor intensidade (+/perfil III). A formação de biofilme foi observada com formas sésseis predominantemente aderidas na interface do meio de cultura e o ar.

Em contraste, a amostra de *C. striatum* 1954BR-RJ/PFGE-IV que também apresentou perfil MDS e que foi previamente isolada de ferida cirúrgica e caracterizada como fracamente produtora de biofilme no vidro (+/perfil III), nos experimentos realizados em condições de limitação de ferro passou a expressar maior a capacidade de produção de biofilme com formas sésseis aderidas nas laterais e no fundo dos tubos de vidro (++/perfil II). Desse modo, para a amostra MDS *C. striatum*, 1954BR-RJ/PFGE-IV a condição de estresse decorrente da limitação de ferro exerceu atividade de regulação-positiva.

Interessantemente, condições de estresse decorrente da limitação de ferro não exerceram influência em possíveis mecanismos relacionados com propriedades adesivas e de produção de biofilme na superfície do vidro da amostra MDS de *C. striatum* 2376BR-RJ/PFGE-X, previamente isolada de ponta de cateter e caracterizada como não produtora de biofilme no vidro (-/perfil IV). Nos ensaios realizados em condições de limitação de ferro também não foi observada produção de biofilme na superfície do vidro pela amostra 2376BR-RJ/PFGE-X (-/perfil IV).

Adicionalmente, em condições de limitação de ferro não foi observada correlação entre a produção de biofilme no vidro e os perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Tabela 8 - Influência de condições de limitação de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície hidrofílica de vidro de amostras de *Corynebacterium striatum*

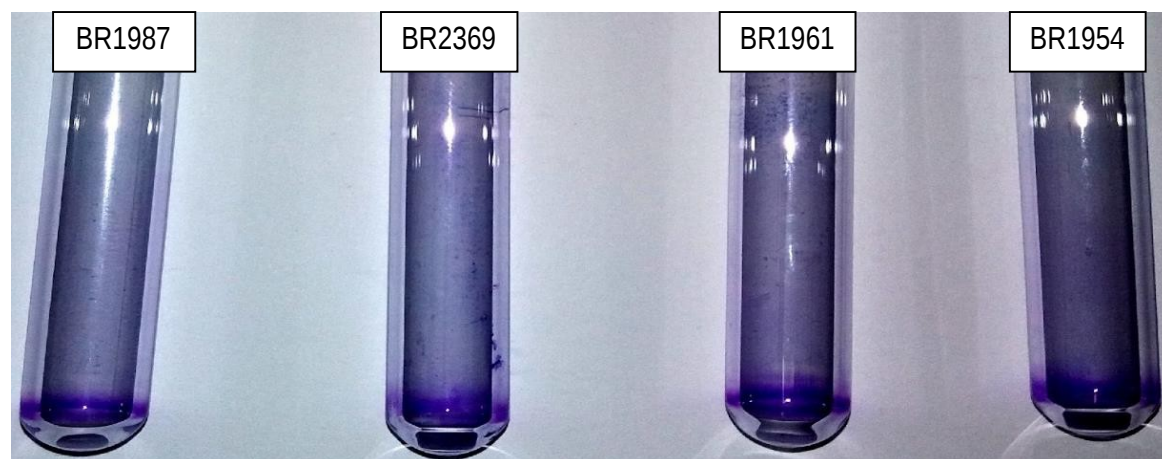
| Amostras/<br>Pulsotipos         | Sítio de<br>isolamento     | Perfis de<br>Resistência aos<br>Antimicrobianos<br>Meio TSB/TSB+2,2'-dipyridyl | Biofilme no vidro<br>Intensidade/Perfil |                                   |
|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
|                                 |                            |                                                                                | Meio TSB                                | TSB+<br>2,2'-dipyridyl            |
| 1987 BR-RJ/<br><b>PFGE-I</b>    | Lavado Bronco-<br>Alveolar | <b>MDR / MDR</b>                                                               | +++ / <b>I</b><br><b>Forte</b>          | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |
| 2369 BR-RJ/<br><b>PFGE-II</b>   | Aspirado<br>Traqueal       | <b>MDR / MDR</b>                                                               | +++ / <b>I</b><br><b>Forte</b>          | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |
| 1961 BR-RJ/<br><b>PFGE-III</b>  | Urina                      | <b>MDS / NT</b>                                                                | +++ / <b>I</b><br><b>Forte</b>          | + / <b>III</b><br><b>Fraco</b>    |
| 1954 BR-RJ/<br><b>PFGE-IV</b>   | Ferida<br>Cirúrgica        | <b>MDS / MDR</b>                                                               | + / <b>III</b><br><b>Fraco</b>          | ++ / <b>II</b><br><b>Moderado</b> |
| 2130 BR-RJ/<br><b>PFGE-V</b>    | Sangue                     | <b>MDR / MDR</b>                                                               | +++ / <b>I</b><br><b>Forte</b>          | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |
| 2237 BR-RJ/<br><b>PFGE-VI</b>   | Sangue                     | <b>MDR / MDR</b>                                                               | ++ / <b>II</b><br><b>Moderado</b>       | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |
| 2296 BR-RJ/<br><b>PFGE-VII</b>  | Cateter Venoso<br>Central  | <b>MDR / MDR</b>                                                               | + / <b>III</b><br><b>Fraco</b>          | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |
| 2103 BR-RJ/<br><b>PFGE-VIII</b> | Ponta de Cateter           | <b>MDR / MDR</b>                                                               | + / <b>III</b><br><b>Fraco</b>          | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |
| 2425 BR-RJ/<br><b>PFGE-IX</b>   | Sangue                     | <b>MDR / MDR</b>                                                               | ++ / <b>II</b><br><b>Moderado</b>       | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |
| 2376 BR-RJ/<br><b>PFGE-X</b>    | Ponta de Cateter           | <b>MDS / MDR</b>                                                               | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>        | - / <b>IV</b><br><b>Negativo</b>  |

Legenda: MDR, multirresistente (três ou mais classes de agentes antimicrobianos); MDS; resistentes < três classes de antimicrobianos; NT, Não testado;

Nota: Adaptado de BAIO *et al.* 2013; RAMOS *et al.* 2019.

Fonte: O autor, 2021

Figura 7 - Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico (vidro), sob condições de limitação de ferro, por cepas *Corynebacterium striatum* oriundas de surto nosocomial de hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro



Legenda: As cepas BR1987/I-MDR, BR2369/II-MDR, BR2130/V-MDR, BR2237/VI-MDR, BR2296/VII-MDR, BR2103/VIII-MDR, BR2425/IX-MDR e BR2376/X apresentam perfil tipo IV, enquanto que a cepa BR1961/III-MDS apresentou perfil III e a cepa BR1954/IV-MDS apresentou perfil tipo II em resposta à limitação de ferro. (C) controle (D) limitação de ferro.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.2.2.3. Influência de condições de suplementação de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro

Os resultados da pesquisa de formação de biofilme na ausência e na presença de  $\text{FeSO}_4$  (sulfato ferroso) com amostras de *C. striatum* foram apresentados na Tabela 9 e ilustrados na Figura 8. Os dados demonstraram que amostras de *C. striatum* submetidas a condições de suplementação de ferro em decorrência da adição de  $\text{FeSO}_4$  (n=9) exibiram comportamentos variados durante o cultivo em tubos de vidro, independente dos sítios de isolamento e dos perfis

PFGE. A maioria das amostras foi capaz de aderir e produzir biofilme na superfície do vidro, porém em intensidades variadas. Não foi observada correlação entre a produção de biofilme no vidro e os perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Condições suplementação de ferro não exerceram influência em possíveis mecanismos relacionados com propriedades adesivas e de produção de biofilme na superfície do vidro de quatro amostras: Perfil I forte (+++) – MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2130BR-RJ/PFGE-V; Perfil III fraco (+) - MDR 2103 BR-RJ/PFGE-VIII; Perfil IV negativo (-) - MDS 2376BR-RJ/PFGE-X.

A amostra MDS 2376BR-RJ/PFGE-X, previamente qualificada como não produtora de biofilme no vidro (perfil IV/-), nos ensaios realizados em condições de suplementação de ferro também foi caracterizada com perfil IV/negativo (-).

Três amostras de *C. striatum* caracterizadas como moderadamente (++/perfil II) (n=1) e fracamente (+++/perfil I) (n=2) produtoras de biofilme no vidro, expressaram maior capacidade de aderir e produzir biofilme em condições de suplementação de ferro: MDR 1954BR-RJ/PFGE-IV (++/perfil II), MDR 2237BR-RJ/PFGE-VI (+++/perfil I) e MDR 2296BR-RJ/PFGE-VII (+++/perfil I).

Em contraste, três amostras caracterizadas como fortemente (+++/perfil I) (n=2) e moderadamente (++/perfil II) (n=1) produtoras de biofilme no vidro, expressaram menor habilidade de aderir e produzir biofilme em condições de suplementação de ferro (+/perfil III): MDR 2369BR-RJ/PFGE-II MDS 1961BR-RJ/PFGE-III, MDR 2425 BR-RJ/PFGE-/IX.

Tabela 9 - Influência de condições ambientes com níveis mais elevados de ferro na capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro de *Corynebacterium striatum*

| Amostras/<br>Pulsotipos         | Sítio de<br>isolamento     | Perfis de<br>Resistência aos<br>Antimicrobianos | Biofilme no vidro<br>Intensidade/Perfil |                             |
|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
|                                 |                            |                                                 | Meio TSB                                | TSB+<br>FeSO <sub>4</sub>   |
| 1987 BR-RJ/<br><b>PFGE-I</b>    | Lavado Bronco-<br>Alveolar | <b>MDR / MDR</b>                                | <b>+++ / I<br/>Forte</b>                | <b>+++ / I<br/>Forte</b>    |
| 2369 BR-RJ/<br><b>PFGE-II</b>   | Aspirado<br>Traqueal       | <b>MDR / MDR</b>                                | <b>+++ / I<br/>Forte</b>                | <b>+ / III<br/>Fraco</b>    |
| 1961 BR-RJ/<br><b>PFGE-III</b>  | Urina                      | <b>MDS / MDR</b>                                | <b>+++ / I<br/>Forte</b>                | <b>+ / III<br/>Fraco</b>    |
| 1954 BR-RJ/<br><b>PFGE-IV</b>   | Ferida<br>Cirúrgica        | <b>MDS / MDR</b>                                | <b>+ / III<br/>Fraco</b>                | <b>++ / II<br/>Moderado</b> |
| 2130 BR-RJ/<br><b>PFGE-V</b>    | Sangue                     | <b>MDR / MDR</b>                                | <b>+++ / I<br/>Forte</b>                | <b>+++ / I<br/>Forte</b>    |
| 2237 BR-RJ/<br><b>PFGE-VI</b>   | Sangue                     | <b>MDR / MDR</b>                                | <b>++ / II<br/>Moderado</b>             | <b>+++ / I<br/>Forte</b>    |
| 2296 BR-RJ/<br><b>PFGE-VII</b>  | Cateter Venoso<br>Central  | <b>MDR / MDR</b>                                | <b>+ / III<br/>Fraco</b>                | <b>+++ / I<br/>Forte</b>    |
| 2103 BR-RJ/<br><b>PFGE-VIII</b> | Ponta de Cateter           | <b>MDR / MDR</b>                                | <b>+ / III<br/>Fraco</b>                | <b>+ / III<br/>Fraco</b>    |
| 2425 BR-RJ/<br><b>PFGE-IX</b>   | Sangue                     | <b>MDR / MDR</b>                                | <b>++ / II<br/>Moderado</b>             | <b>+ / III<br/>Fraco</b>    |
| 2376 BR-RJ/<br><b>PFGE-X</b>    | Ponta de Cateter           | <b>MDS / MDR</b>                                | <b>- / IV<br/>Negativo</b>              | <b>- / IV<br/>Negativo</b>  |

Legenda: MDR, multirresistente (três ou mais classes de agentes antimicrobianos); MDS; resistentes < três classes de antimicrobianos; NT, Não testado.

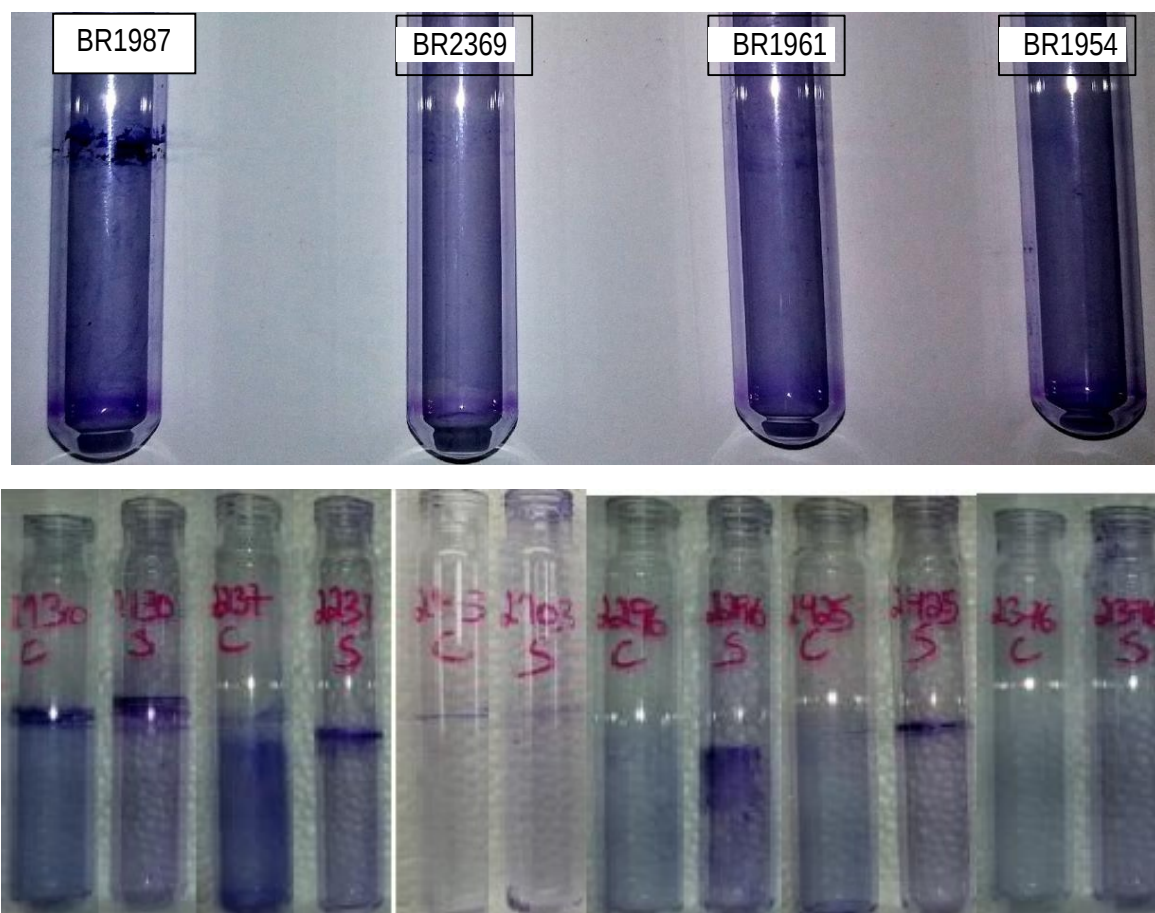
Nota: Adaptado de Baio *et al.* 2013;

Ramos *et al.* 2019.

Fonte: O autor, 2021



Figura 8 - Produção de biofilme em substrato abiótico hidrofílico (vidro), por cepas *Corynebacterium striatum* oriundas de hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro crescidas em meio suplementado com sulfato ferroso



Legenda: As amostras BR1987/I-MDR, BR2237/VI-MDR, BR2296/VII-MDR apresentaram perfil tipo I; a amostra BR1954/IV apresentou perfil tipo II; as amostras BR2369/II-MDR, BR1961/III, BR2103/VIII- MDR e BR2425/IX-MDR perfil tipo III; e, a amostra BR2376/X apresentou perfil tipo IV. (S) suplementação com sulfato ferroso e (C) controle.

Fonte: O autor, 2021

#### 3.2.2.4. Heterogeneidade amostra-dependente da capacidade de produção de biofilme na superfície de vidro em condições de limitação e de suplementação de ferro

A análise comparativa dos resultados apresentados na Tabela 10 indicou que os mecanismos de sobrevivência e de disseminação do patógeno *C. striatum* foram influenciados pelas concentrações de ferro presentes no meio ambiente. Diferentes aspectos foram observados quanto aos perfis e as intensidades de células sésseis aderidas e de biofilmes produzidos na superfície de vidro em condições de limitação e de suplementação de ferro. Os dados

apresentados na tabela enfatizaram que a influência das concentrações de ferro exercida na produção de biofilme no vidro foi dependente da amostra de *C. striatum* testada.

Três amostras MDR de *C. striatum*, inclusive duas identificadas como fortemente produtoras de biofilme em tubos de vidro contendo meio TSB sem adição de quelante ou FeSO<sub>4</sub>, quando testadas em condições de suplementação de ferro, suas atividades foram mantidas inalteradas: amostras MDR1987BR-RJ/PFGE-I e MDR 2130BR-RJ/PFGE-V (+++/perfil I); MDR 2103 BR-RJ/PFGE-VIII (+/perfil III). Entretanto, quando avaliadas em condições de limitação de ferro a capacidade de aderência e produção de biofilme na superfície do vidro foi totalmente inibida (-/perfil IV).

Duas amostras de *C. striatum* expressando perfis MDR (2237BR-RJ/PFGE-VI e 2296BR-RJ/PFGE-VII), demonstraram incapacidade de produzir biofilme na superfície do vidro (-/perfil IV) quando avaliadas em condições de limitação de ferro. Em contraste, foram identificadas como fortemente produtoras de biofilme no vidro em condições de suplementação de ferro (+++/perfil I).

Apenas uma amostra MDR de *C. striatum*, 1954BR-RJ/PFGE-IV, identificada com fracamente positiva/perfil III nos ensaios em tubos de vidro contendo meio TSB, sem adição de quelante ou FeSO<sub>4</sub>, foi capaz de aderir e produzir biofilme na superfície do vidro mais intensamente em ambas condições de limitação e de suplementação de ferro (++/perfil II).

Tanto em condições de limitação quanto de suplementação de ferro, três amostras de *C. striatum* caracterizadas como fortemente MDR 2369BR-RJ/PFGE-II, MDS 1961BR-RJ/PFGE-III e moderadamente MDR 2425 BR-RJ/PFGE-/IX produtoras de biofilme na superfície do vidro, passaram a expressar menor capacidade de aderir a superfície do vidro.

Para a amostra MDS de *C. striatum* 2376BR-RJ/PFGE-X, previamente isolada de ponta de cateter e caracterizada como não produtora de biofilme no vidro (-/perfil IV), também não foi observada produção de biofilme na superfície do vidro nos ensaios realizados em condições de suplementação e de limitação de ferro.

Algumas amostras de *C. striatum* (n=3) apresentaram maior produção biofilme na superfície do vidro em condições de limitação (n=1) e/ou de suplementação de ferro: 1954 BR-RJ/PFGE-IV (++/perfil II), 2237 BR-RJ/PFGE-VI, 2296 BR-RJ/PFGE-VII (+++/perfil I).

Oito amostras de *C. striatum* produtoras de biofilme na superfície do vidro passaram a expressar essas atividades em menor intensidade em condições de suplementação (n=3) e/ou de limitação (n=8) de ferro. Incluindo sete amostras que foram identificadas como não produtoras de biofilme no vidro (-/perfil IV) apenas em condições de limitação de ferro.

Tabela 10 - Perfis de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e de produção de biofilme na superfície hidrofílica do vidro de amostras de *Corynebacterium striatum* expressos em diferentes concentrações de ferro

| Amostras/<br>Pulsotipos            | Sítio de<br>isolamento        | Perfis de<br>Susceptibilidade Antimicrobiana |                        |                           | Biofilme no vidro<br>Intensidade/Perfil |                            |                            |
|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                    |                               | Meio<br>TSB                                  | TSB+<br>2,2'-dipyridyl | TSB+<br>FeSO <sub>4</sub> | Meio TSB                                | TSB+<br>2,2'-dipyridyl     | TSB+<br>FeSO <sub>4</sub>  |
| 1987<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-I</b>    | Lavado<br>Bronco-<br>Alveolar | <b>MDR</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | +++ / I<br><b>Forte</b>                 | - / IV<br><b>Negativo</b>  | +++ / I<br><b>Forte</b>    |
| 2369 BR-<br>RJ/<br><b>PFGE-II</b>  | Aspirado<br>Traqueal          | <b>MDR</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | +++ / I<br><b>Forte</b>                 | - / IV<br><b>Negativo</b>  | + / III<br><b>Fraco</b>    |
| 1961<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-III</b>  | Urina                         | <b>MDS</b>                                   | NT                     | <b>MDR</b>                | +++ / I<br><b>Forte</b>                 | + / III<br><b>Fraco</b>    | + / III<br><b>Fraco</b>    |
| 1954<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-IV</b>   | Ferida<br>Cirúrgica           | <b>MDS</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | + / III<br><b>Fraco</b>                 | ++ / II<br><b>Moderado</b> | ++ / II<br><b>Moderado</b> |
| 2130<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-V</b>    | Sangue                        | <b>MDR</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | +++ / I<br><b>Forte</b>                 | - / IV<br><b>Negativo</b>  | +++ / I<br><b>Forte</b>    |
| 2237<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-VI</b>   | Sangue                        | <b>MDR</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | ++ / II<br><b>Moderado</b>              | - / IV<br><b>Negativo</b>  | +++ / I<br><b>Forte</b>    |
| 2296<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-VII</b>  | Cateter<br>Venoso<br>Central  | <b>MDR</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | + / III<br><b>Fraco</b>                 | - / IV<br><b>Negativo</b>  | +++ / I<br><b>Forte</b>    |
| 2103<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-VIII</b> | Ponta de<br>Cateter           | <b>MDR</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | + / III<br><b>Fraco</b>                 | - / IV<br><b>Negativo</b>  | + / III<br><b>Fraco</b>    |
| 2425<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-IX</b>   | Sangue                        | <b>MDR</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | ++ / II<br><b>Moderado</b>              | - / IV<br><b>Negativo</b>  | + / III<br><b>Fraco</b>    |
| 2376<br>BR-RJ/<br><b>PFGE-X</b>    | Ponta de<br>Cateter           | <b>MDS</b>                                   | <b>MDR</b>             | <b>MDR</b>                | - / IV<br><b>Negativo</b>               | - / IV<br><b>Negativo</b>  | - / IV<br><b>Negativo</b>  |

Legenda: MDR, multirresistente (três ou mais classes de agentes antimicrobianos); MDS; resistentes < três classes de antimicrobianos; NT, Não testado;

Nota: Adaptado de BAIO *et al.* 2013;

RAMOS *et al.* 2019.

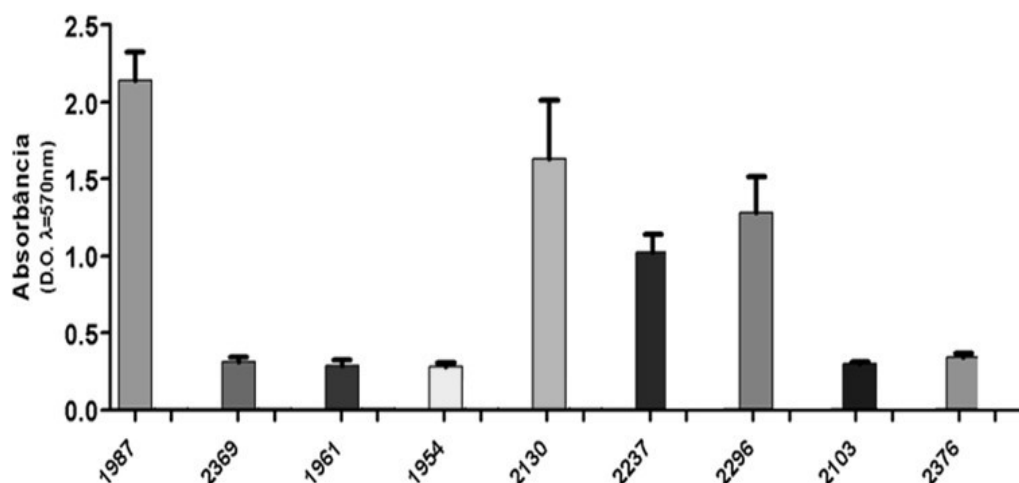
Fonte: O autor, 2021

### 3.2.3. Propriedades adesivas, viabilidade bacteriana e produção de biofilme na superfície de poliestireno

Na Figura 9 foram apresentados os dados relativos à análise semi-quantitativa da capacidade produção de biofilme na superfície abiótica de natureza hidrofóbica de poliestireno (cargas negativas) de nove amostras clínicas de *C. striatum* parcialmente estudadas. Conforme previamente descrito, no presente estudo foi observada produção de biofilme no poliestireno em diferentes intensidades para todas as amostras de *C. striatum* testadas.

Na avaliação da habilidade de aderência e de produção de biofilme em superfície de poliestireno caracterizado como, material plástico de natureza hidrofóbica, as nove amostras de *C. striatum* foram classificadas nas seguintes categorias: Fortes (+++): n = 4, MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2130BR-RJ/PFGE-V, MDR 2237BR-RJ/PFGE-VI, MDR 2296BR-RJ/PFGE-VII; Moderadas (++) : n=5, MDR 2369/PFGE-II, MDS 1961BR-RJ/PFGE-III, MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV, MDR 2103BR-RJ/PFGE-VIII, e MDS 2376BR-RJ/PFGE-X.

Figura 9 - Propriedades adesivas, viabilidade bacteriana e produção de biofilme em superfície abiótica de natureza hidrofóbica de amostras de *Corynebacterium striatum* (n=10) avaliadas pela técnica semi-quantitativa realizada em microplacas de poliestireno



Legenda: Amostras: MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2369/PFGE-II, MDS 1961BR-RJ/PFGE-III, MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV, MDR 2130BR-RJ/PFGE-V, MDR 2237BR-RJ/PFGE-VI, MDR 2296BR-RJ/PFGE-VII, MDR 2103BR-RJ/PFGE-VIII, MDR 2425/PFGE-IX e MDS 2376BR-RJ/PFGE-X.

Fonte: O autor, 2021

### 3.2.3.1 Influência de concentrações ferro na aderência e produção de biofilme em superfícies hidrofóbicas de plástico: poliestireno e Thermanox®

### 3.2.3.2. Influência de condições de limitação de ferro na produção de biofilme em superfícies de poliestireno

Na Figura 10A, foram apresentados resultados dos ensaios de formação de biofilme na ausência e na presença de quelante de ferro (2,2'-dipyridyl). Nos ensaios semi-quantitativos realizados em microplacas de poliestireno, em condições de limitação de ferro foi observada menor produção de biofilme para todas as amostras analisadas, porém em intensidades variadas. As amostras MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2130BR-RJ/PFGE-V, MDR 2237BR-RJ/PFGE-VI, MDR 2296BR-RJ/PFGE-VII, MDR 2103 BR-RJ/PFGE-VIII, MDS 2376 BR-RJ/PFGE-X apresentaram a capacidade de produção de biofilme no poliestireno em condições de limitação de ferro significativamente mais reduzidas ( $P < 0,0001$ ), do que as amostras MDR 2369 BR-RJ/PFGE-II ( $P = 0,0013$ ), MDS1961 BR-RJ/PFGE-III ( $P = 0,002$ ) e MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV ( $P = 0,003$ ). Deste modo, para o patógeno *C. striatum*, a condição de estresse decorrente da limitação de ferro exerceu atividade de regulação-negativa dos mecanismos de produção de biofilme no poliestireno para todas as amostras testadas, independente dos sítios de isolamento, da expressão dos perfis PFGE e MDR. Entretanto, não foi verificada ausência de formação de biofilme no poliestireno em condições de limitação de ferro para nenhuma das amostras testadas.

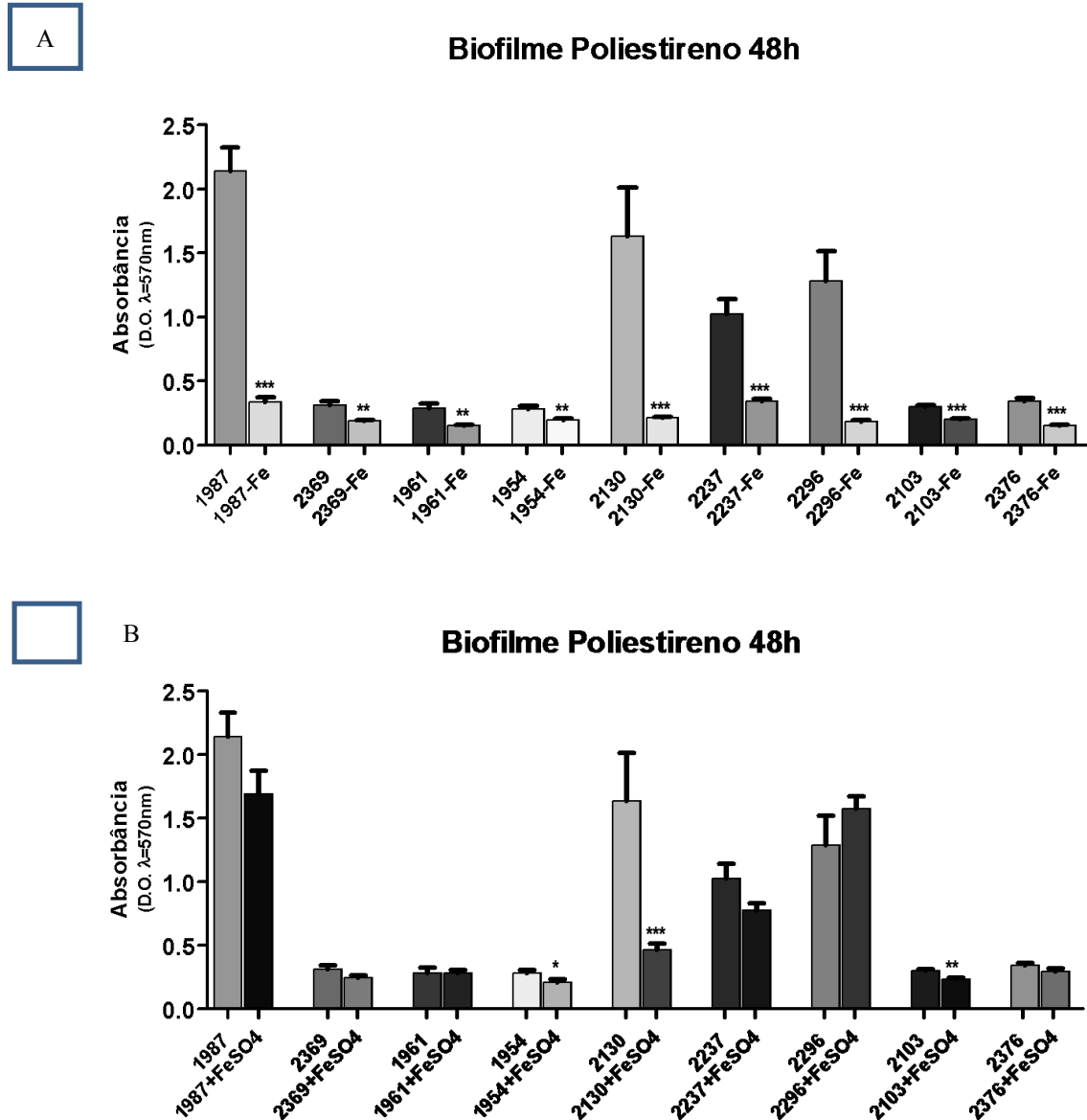
### 3.2.3.3. Influência de condições de suplementação de ferro na produção de biofilme em superfícies de poliestireno

Os resultados da análise semi-quantitativa da capacidade de produção de biofilme em superfície abiótica hidrofóbica de poliestireno realizados na ausência e na presença de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) de amostras de *C. striatum* representantes dos pulsotipos I a X foram apresentados na Figura 10 B. Nos ensaios realizados em condições de suplementação de ferro

foi observada produção de biofilme no poliestireno para todas as amostras de *C. Striatum* testadas, porém em diferentes intensidades.

Apenas para a amostra MDR 2296BR-RJ/PFGE-VII foi observado aumento de produção de biofilme no poliestireno em condições de suplementação de ferro, enquanto para a amostra MDS1961 BR-RJ/PFGE-III a produção de biofilme na ausência e na presença de sulfato ferroso foi similar. Em contraste, para a maioria das amostras testadas (n=7) foi observada redução, sem completa inibição, da produção de biofilme no poliestireno em condições de suplementação de ferro: MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2369 BR-RJ/PFGE-II, MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV, MDR 2130 BR-RJ/PFGE-V, MDR 2237BR-RJ/PFGE-VI, MDR 2103 BR-RJ/PFGE-VIII e MDS 2376 BR-RJ/PFGE-X. Deste modo, para o patógeno *C. striatum*, a condição de suplementação de ferro exerceu atividade de regulação-negativa ou positiva dos mecanismos de produção de biofilme no poliestireno, dependente das amostras testadas, independente dos sítios de isolamento e da expressão dos perfis PFGE e MDR. A capacidade de produção de biofilme na superfície de poliestireno da amostra MDR 2130 BR-RJ/PFGE-V foi intensamente reduzida tanto em condições de limitação quanto de suplementação de ferro.

Figura 10 - Habilidade de produção de biofilme em substrato abiótico hidrofóbico (poliestireno) de amostras de *C. striatum* oriundas de hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro



Legenda: (A) limitação de ferro (B) suplementação de ferro cultivadas na presença do quelante dipiridyl e FeSO<sub>4</sub> (sulfato ferroso), respectivamente: BR1987/I-MDR, BR2369/II-MDR, BR1961/III, BR1954/IV, BR2130/V-MDR, BR2237/VI-MDR, BR2296/VII-MDR, BR2103/VIII-MDR, BR2376/X.

Fonte: O autor, 2021

### 3.2.3.4. Influência de condições de limitação de ferro na viabilidade celular e produção de biofilme em lamínulas Thermanox®

Os resultados dos ensaios quantitativos de produção de biofilme em superfícies de lamínulas Thermanox® na ausência e na presença de quelante de ferro realizados com cinco amostras de *C. striatum* foram demonstrados na Figura 11 A.

Nos testes realizados em lamínulas Thermanox® foram observadas formas sésseis viáveis e produção de biofilme na ausência de quelante de ferro para todas as cinco amostras de *C. striatum* analisadas, porém em intensidades variadas: amostras MDR 2103BR-RJ/PFGE- VIII > MDR 1987BR-RJ/PFGE-I > MDS 1961BR-RJ/PFGE-III > MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV

> MDR 2369BR-RJ/PFGE-II.

Em condições de limitação de ferro também foram detectadas formas sésseis viáveis e produção de biofilme em diferentes intensidades em superfícies de lamínulas Thermanox® para todas as amostras de *C. striatum*. Interessantemente, apenas para as amostras MDS1961BR- RJ/PFGE-III e MDR 2103BR-RJ/PFGE-VIII foi observada redução do número de formas sésseis viáveis e de produção de biofilme em lamínulas Thermanox®. Em contraste, as amostras MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV e MDR 2369 BR-RJ/PFGE-

II apresentaram um aumento significativo no número de células sésseis viáveis e de produção de biofilme nesse substrato plástico (Figura 11 A e Tabela 11).

Deste modo, para o patógeno *C. striatum*, a condição de estresse decorrente da limitação de ferro também exerceu atividade de regulação-negativa ou positiva dos mecanismos de produção de biofilme na superfície de lamínulas Thermanox®, dependente das amostras testadas, independente dos sítios de isolamento e da expressão dos perfis PFGE e MDR. Entretanto, não foi verificada ausência de formação de biofilme na superfície de plástico Thermanox® em condições de limitação de ferro para nenhuma das amostras testadas.

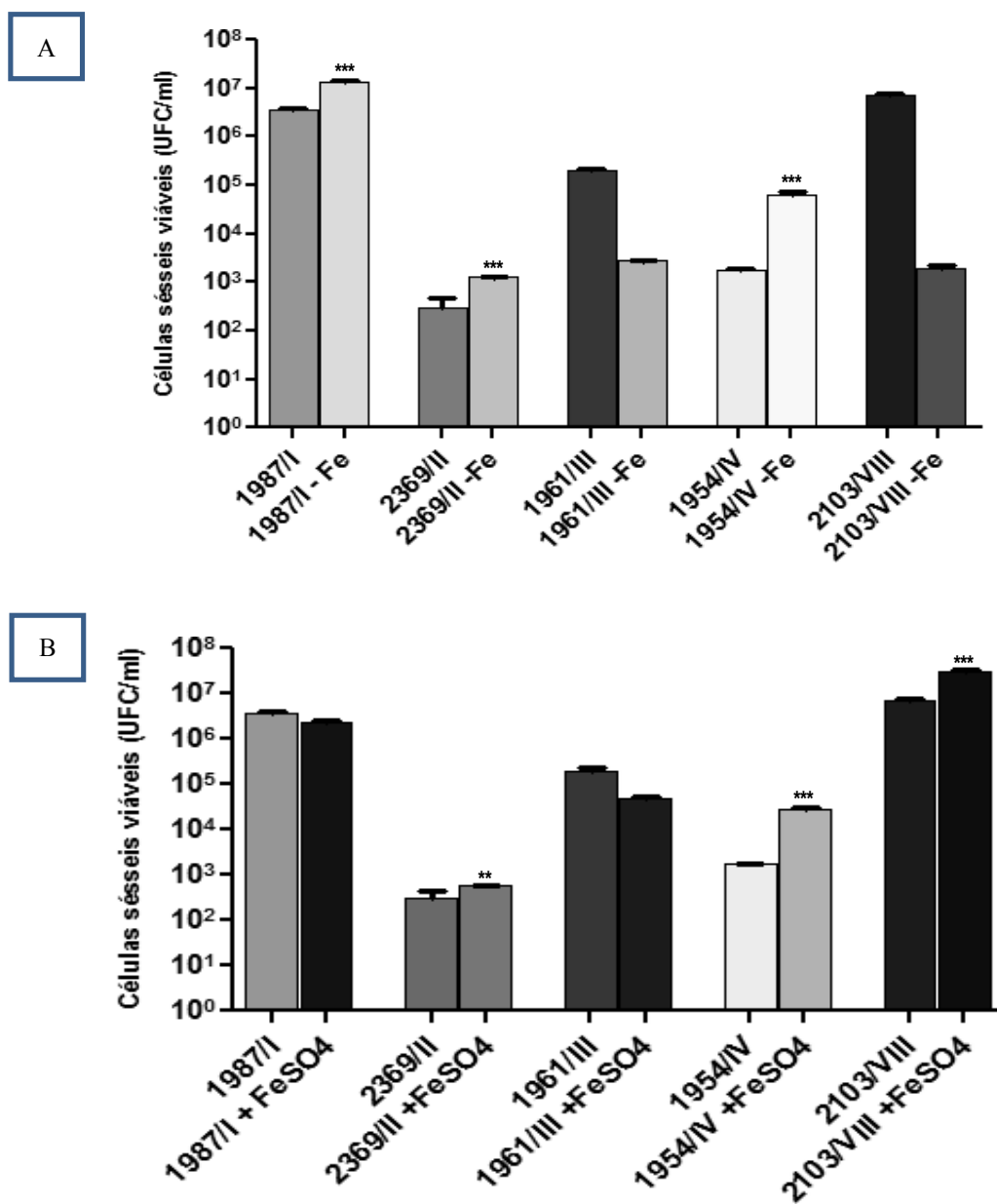


### 3.2.3.5. Condições de suplementação de ferro na viabilidade celular e produção de biofilme em lamínulas Thermanox®

Os resultados dos ensaios quantitativos de produção de biofilme em superfícies de lamínulas Thermanox® na ausência e na presença sulfato ferroso realizados com cinco amostras de *C. striatum* foram demonstrados na Figura 11 B. Nos ensaios realizados em condições de suplementação de ferro foram detectadas formas sésseis viáveis extraídas dos biofilmes produzidos nas superfícies de lamínulas Thermanox® para todas as amostras de *C. striatum* testadas, porém em diferentes intensidades.

Em condições de suplementação de ferro também foram detectadas formas sésseis viáveis e produção de biofilme em diferentes intensidades em superfícies de lamínulas Thermanox® para todas as amostras de *C. striatum*. Interessantemente, foi observada redução do número de formas sésseis viáveis e de produção de biofilme em lamínulas Thermanox® para as amostras MDS1961BR-RJ/PFGE-III e MDR 1987BR-RJ/PFGE-I. Em contraste, as amostras MDR 2369 BR-RJ/PFGE-II, MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV e a MDR 2103BR-RJ/PFGE-VIII apresentaram um aumento significativo no número de células sésseis viáveis e de produção de biofilme nesse substrato plástico.

Figura 11 - Habilidade de produção de biofilme superfície hidrofóbica de lamínulas de Thermanox® de cinco amostras de *C. striatum*



Legenda: (A) limitação de ferro (B) suplementação de ferro, cultivadas na presença de  $\text{FeSO}_4$  (sulfato ferroso): BR1987/I-MDR, BR2369/II-MDR, BR1961/III, BR1954/IV, BR2103/VIII-MDR.

Fonte: O autor, 2021

Tabela 11 - Análise semi-quantitativa e quantitativa da produção de biofilme em poliestireno e lamínulas de Thermanox® por amostras de *Corynebacterium striatum*

| Produção de biofilme em poliestireno e lamínula de Thermanox® |                                          |                         |                                |                                                       |                                         |                                         |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Amostras                                                      | Análise semi-quantitativa (poliestireno) |                         |                                | Contagem de viáveis (UFC/ml) (lamínula de Thermanox®) |                                         |                                         |
|                                                               | TSB                                      | TSB + dipiridil (400mM) | TSB + FeSO <sub>4</sub> (1g/L) | TSB                                                   | TSB + 2,2'-dipyridyl (400mM)            | TSB + FeSO <sub>4</sub> (1g/L)          |
| 1987 BR-RJ/<br>PFGE-I-<br><b>MDR</b>                          | +++                                      | ++                      | +++                            | $3,63 \times 10^6 \pm 4,04 \times 10^5$               | $1,30 \times 10^7 \pm 1,73 \times 10^6$ | $2,30 \times 10^6 \pm 5,29 \times 10^5$ |
| 2369 BR-RJ/<br>PFGE-II-<br><b>MDR</b>                         | ++                                       | +                       | ++                             | $3,00 \times 10^3 \pm 2,65 \times 10^2$               | $1,23 \times 10^4 \pm 5,77 \times 10^2$ | $5,67 \times 10^3 \pm 5,77 \times 10^2$ |
| 1961 BR-RJ/<br>PFGE-III-<br><b>MDS</b>                        | ++                                       | +                       | ++                             | $1,98 \times 10^5 \pm 6,97 \times 10^4$               | $3,02 \times 10^4 \pm 8,04 \times 10^3$ | $5,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^4$ |
| 1954 BR-RJ/<br>PFGE-IV-<br><b>MDS</b>                         | ++                                       | +                       | ++                             | $1,77 \times 10^4 \pm 1,16 \times 10^3$               | $6,33 \times 10^4 \pm 1,53 \times 10^4$ | $2,80 \times 10^4 \pm 4,36 \times 10^3$ |
| 2130 BR-RJ/<br>PFGE-V-<br><b>MDR</b>                          | +++                                      | +                       | +++                            | NR                                                    | NR                                      | NR                                      |
| 2237 BR-RJ/<br>PFGE-VI-<br><b>MDR</b>                         | +++                                      | ++                      | +++                            | NR                                                    | NR                                      | NR                                      |
| 2296 BR-RJ/<br>PFGE-VII-<br><b>MDR</b>                        | +++                                      | +                       | +++                            | NR                                                    | NR                                      | NR                                      |
| 2103 BR-RJ/<br>PFGE-VIII-<br><b>MDR</b>                       | ++                                       | +                       | ++                             | NR                                                    | NR                                      | NR                                      |
| 2376 BR-RJ/<br>PFGE-X-<br><b>MDR</b>                          | ++                                       | ++                      | ++                             | NR                                                    | NR                                      | NR                                      |

Legenda: (+) Fracamente aderente; (++) Moderadamente aderente; (+++) Fortemente aderente; UFC, Unidades Formadoras de Colônias; NR, não realizado.

Fonte: O autor, 2021

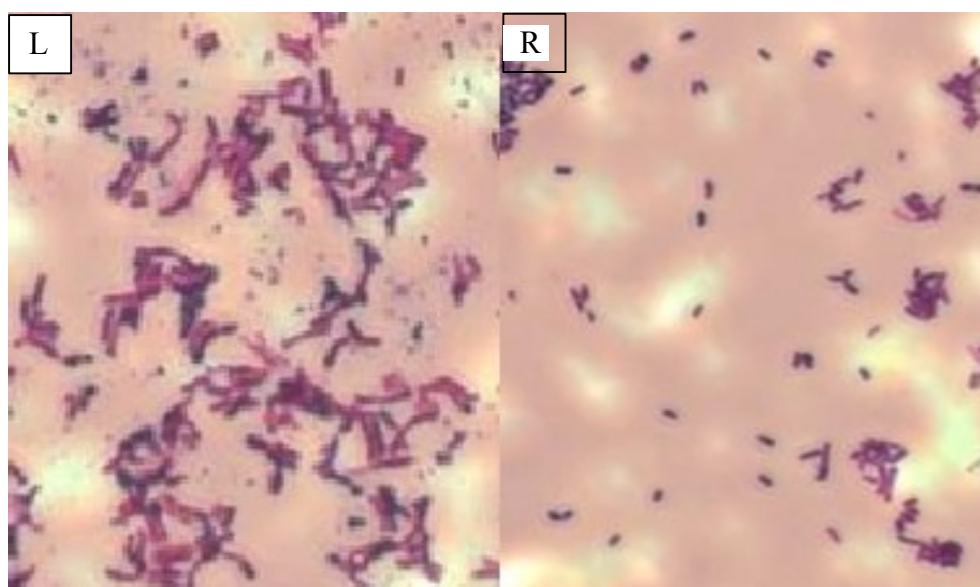
### 3.3. Aspectos morfológicos de formas planctônicas e sésseis de células bacterianas cultivadas em diferentes concentrações de ferro

Aspectos morfológicos relacionados à divisão celular de formas bacterianas em estado planctônico e sésil foram observados entre os mecanismos de sobrevivência e disseminação do patógeno *C. striatum* influenciados pela disponibilidade de ferro no meio ambiente.

### 3.3.1. Influência de condições de limitação de ferro na morfologia de bactérias de vida livre

Ensaio experimentais realizados em condições de estresse, em decorrência de cultivos de microrganismos realizados na presença de quelante de ferro (48 h), demonstraram a presença de maior número de bactérias planctônicas expressando formas alongadas, conforme ilustrado nas fotomicrografias da Figura 12. As amostras de *C. striatum* submetidas a novo cultivo em meio sem adição de quelante de ferro (48 h) exibiram células, predominantemente, em formas de cocobacilos expressando propriedades autoagregativas, e baixo número de células apresentando formas filamentosas.

Figura 12 - Morfologia celular de formas planctônicas de *Corynebacterium striatum*



Legenda: Bactérias cultivadas em (L) condições de limitação de ferro (48 h) e posteriormente cultivadas em (R) meio TSB (Trypticase Soy Broth) sem adição de quelante de ferro dipiridyl 2'2 (48 h); Método de Gram, ampliação 1000x.

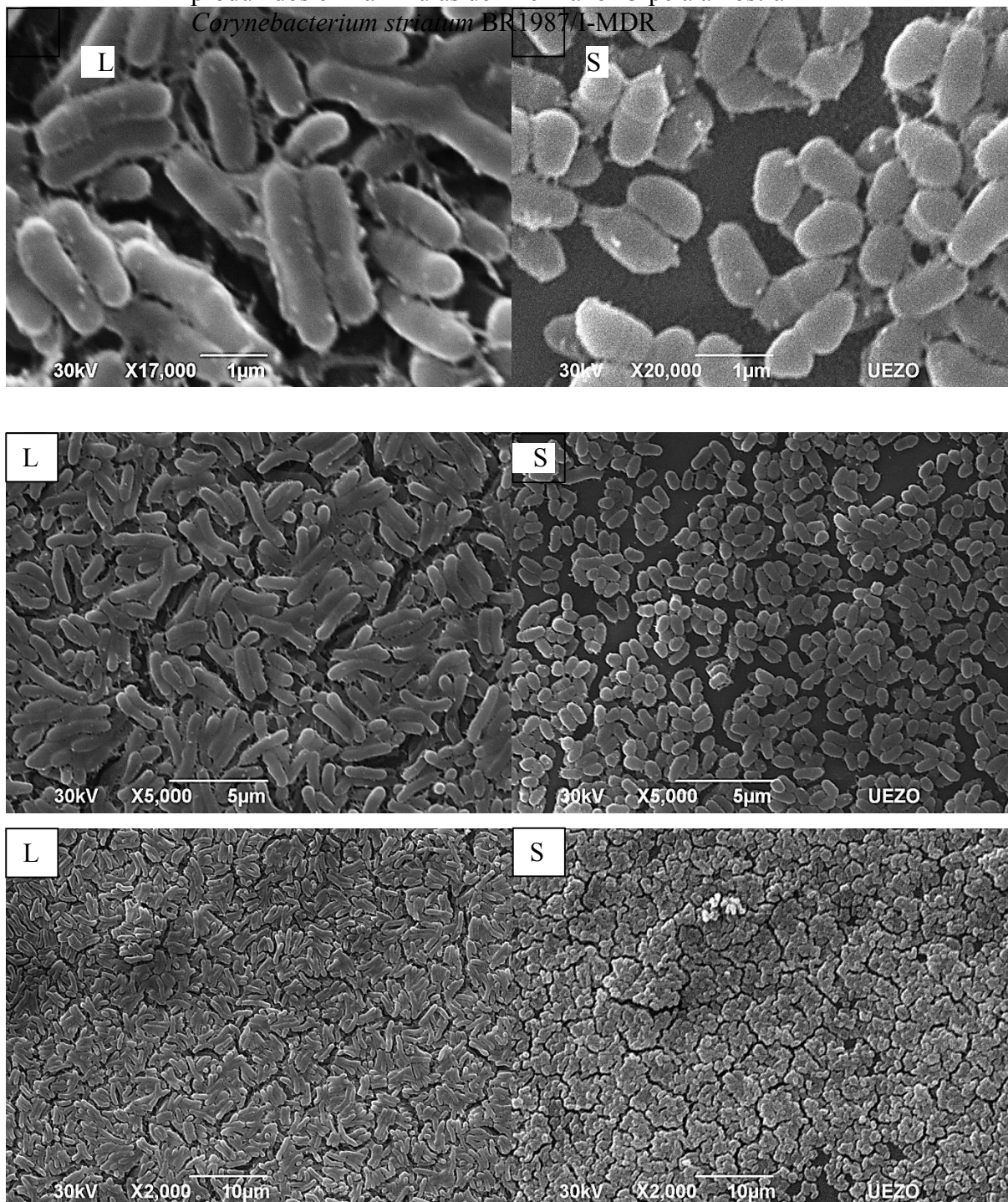
Fonte: O autor, 2021

### 3.3.2. Influência de condições de limitação de ferro na morfologia de bactérias de vida sésil

Nas Figuras 13 a 16 foram apresentadas as eletromicrografias de varredura obtidas durante os ensaios de produção de biofilme em diferentes concentrações de ferro realizados em superfícies de lamínulas Thermanox® com as amostras MDR-1987BR-RJ/PFGE-I, MDR-2369BR-RJ/PFGE-II, MDS-1961BR-RJ/PFGE-III e MDS-1954BR-RJ/PFGE-IV.

Fotomicrografias das células sésseis de biofilme formado em condições de limitação de ferro revelaram a presença de maior número de formas alongadas, à semelhança do ocorrido com as bactérias planctônicas na Figura 12. Todas as amostras de *C. striatum* analisadas apresentaram morfologia filamentosa após 48 h de crescimento em meio TSB acrescido do quelante de ferro, dipiridyl, em um número bastante elevado de células sésseis, quando comparados ao comprimento celular após a formação dos biofilmes em condições controle e/ou de suplementação de ferro.

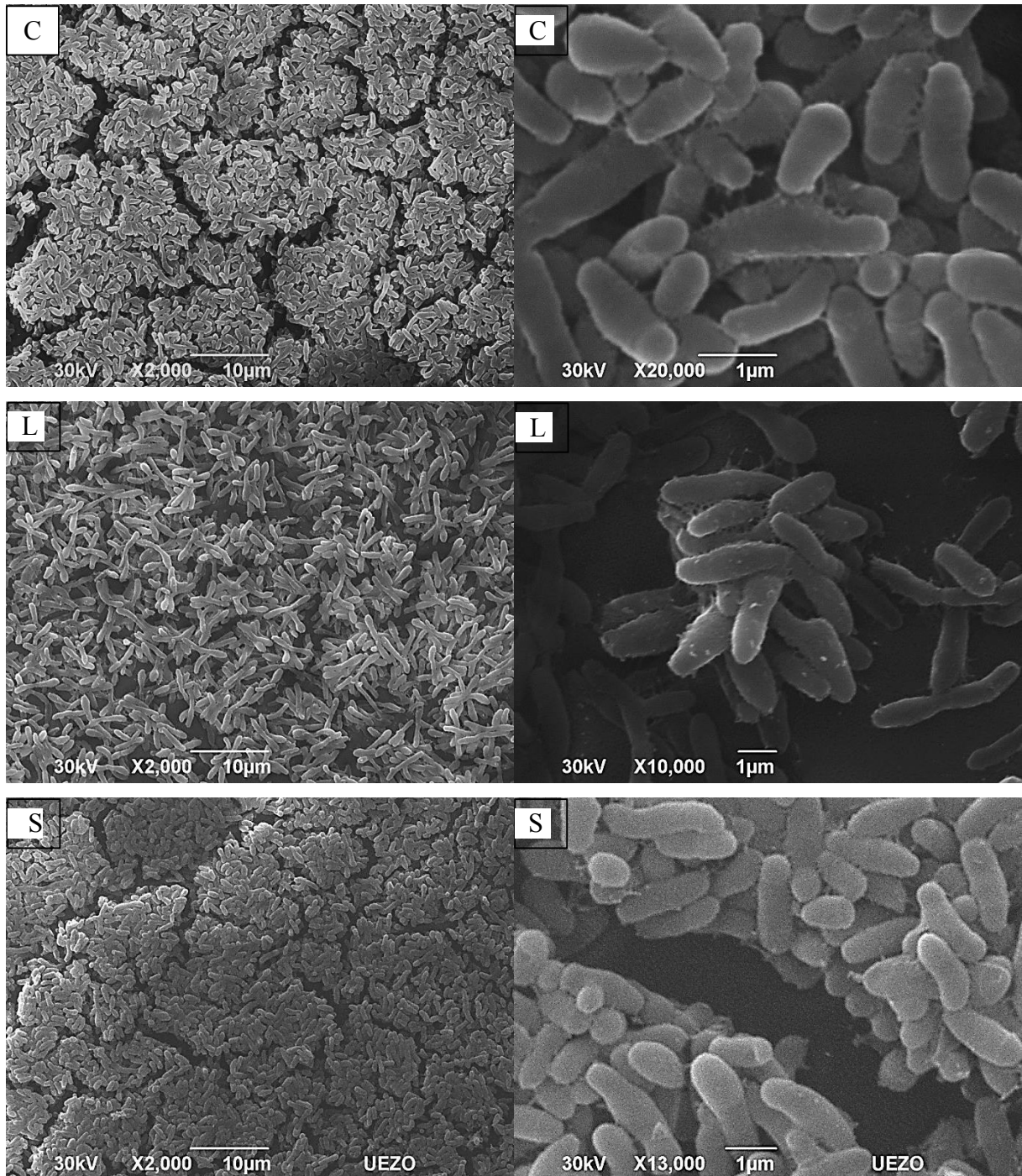
Figura 13 - Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lâminulas de Thermanox® pela amostra *Corynebacterium striatum* BR1987/I-MDR



Legenda: (L) condição de limitação de ferro (48 h) exibindo formas alongadas; (S) condição de suplementação de ferro (48 h) exibindo formas cocobacilares.

Fonte: O autor, 2021

Figura 14 - Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lamínulas de Thermanox® pela amostra *Corynebacterium striatum* BR2369/II- MDR

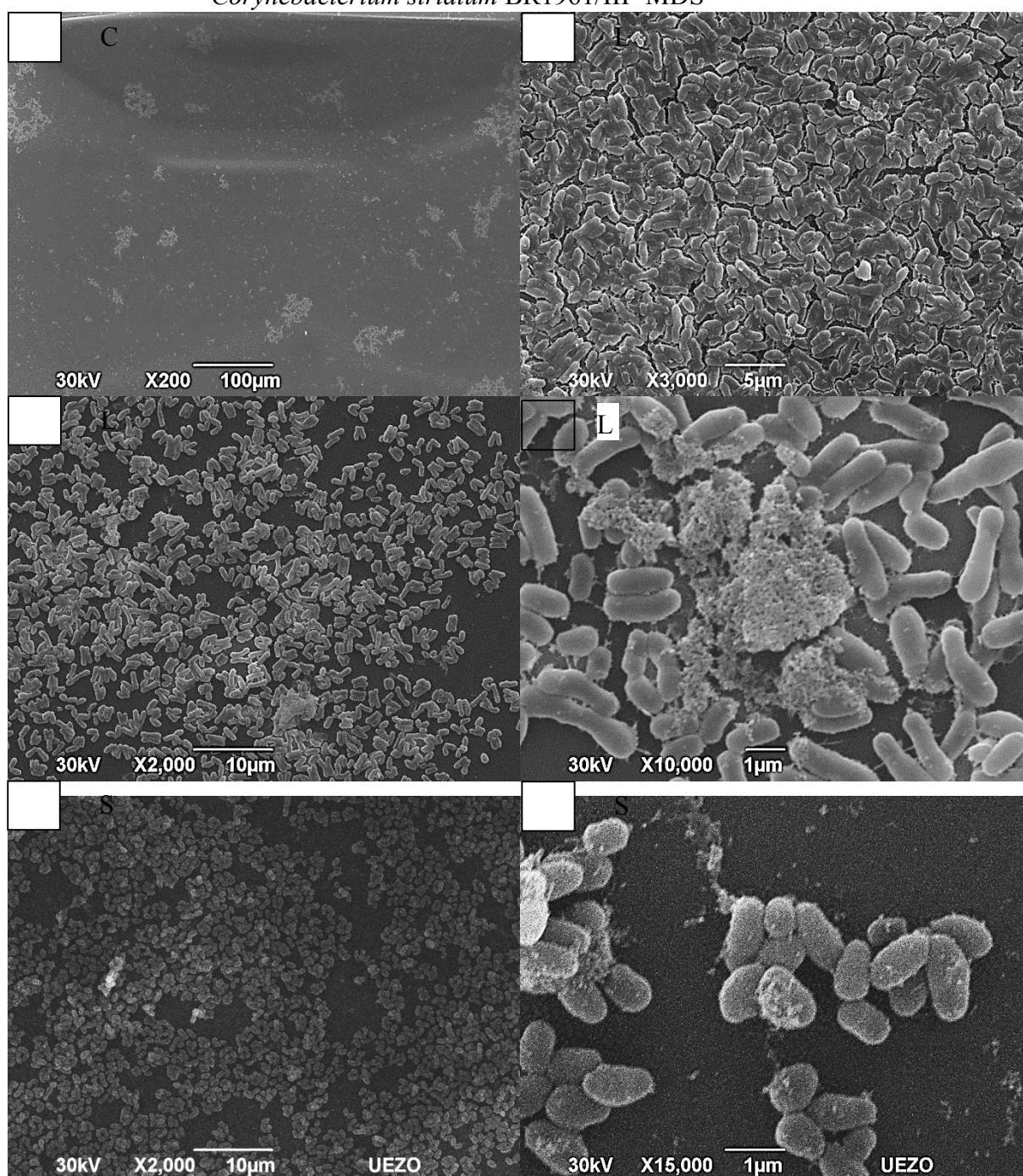


Legenda: (C) condição controle; (L) condições de limitação de ferro (48 h) exibindo formas alongadas; (S) condição de suplementação de ferro (48 h) exibindo formas cocobacilares.

Fonte: O autor, 2021.



Figura 15 - Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lamínulas de Thermanox® pela amostra *Corynebacterium striatum* BR1961/III- MDS

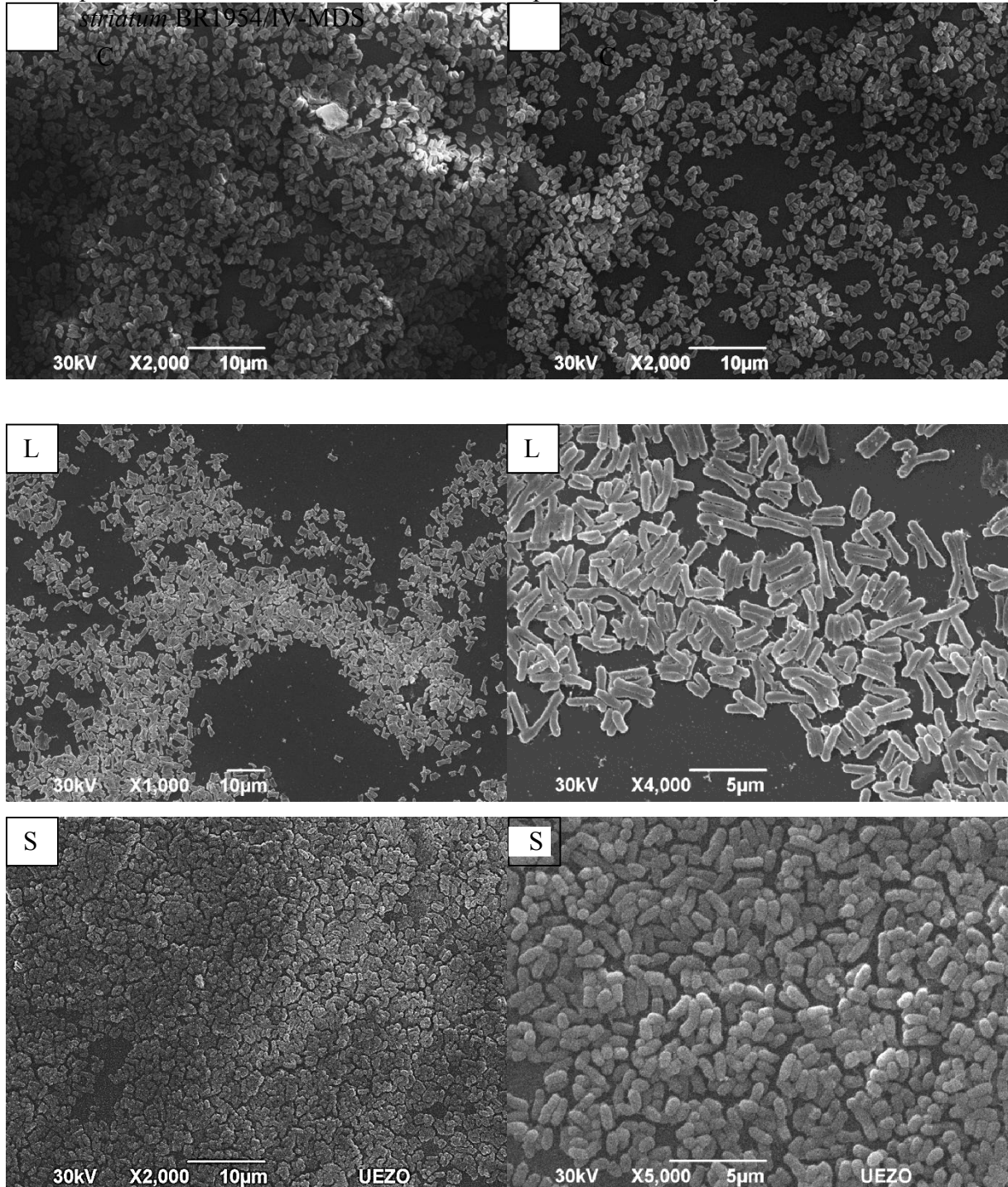


Legenda: (C) condição controle; (L) condição de limitação de ferro (48 h) exibindo formas alongadas; (S) condição suplementação de ferro (48 h) exibindo formas cocobacilares.

Fonte: O autor, 2021



Figura 16 - Eletromicrografias de varredura de bactérias sésseis de biofilmes produzidos em lâminulas de Thermanox® pela amostra *Corynebacterium*



Legenda: (C) condição controle; (L) condições de limitação de ferro (48 h) exibindo formas alongadas; (S) condição suplementação de ferro (48 h) exibindo formas cocobacilares.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.3. Aspectos morfológicos e tintoriais de formas sésseis de células bacterianas e de biofilmes formados em lamínulas Thermanox®

As imagens representativas dos resultados dos experimentos realizados com quatro amostras de *C. striatum* avaliadas pelos métodos de microscopia realizando etapa inicial de coloração do biofilme em lamínulas Thermanox® com corantes Comassie Blue e Safranina apresentando afinidades por moléculas de natureza proteica e sacarídica, respectivamente foram apresentadas nas Figuras 17 – 20: amostras MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2369 BR-RJ/PFGE-II, MDS1961BR-RJ/PFGE-III, MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV.

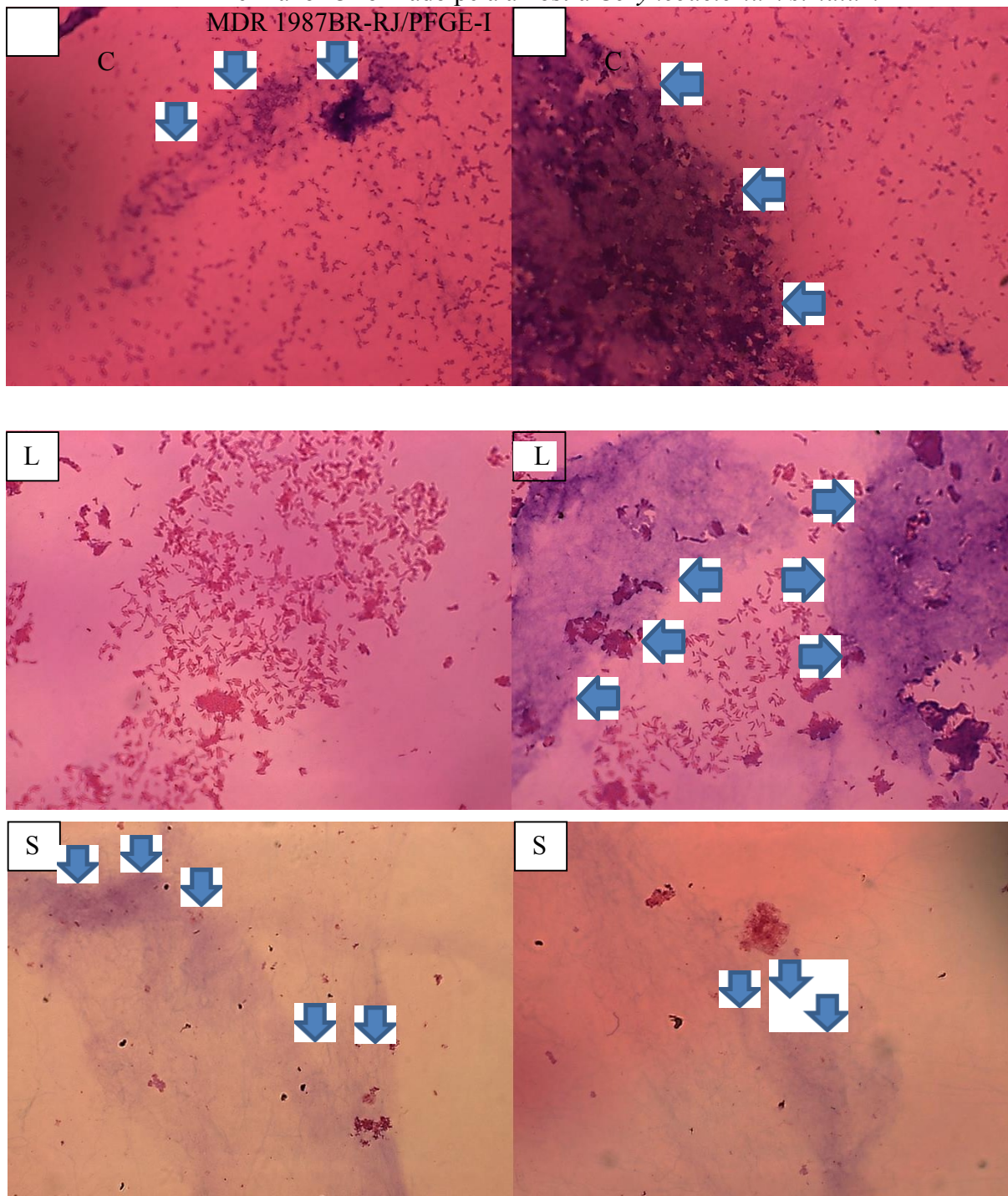
As amostras de *C. striatum* MDR 1987BR-RJ/PFGE-I, MDR 2369 BR-RJ/PFGE-II, MDS1961BR-RJ/PFGE-III, MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV apresentaram formas sésseis coradas pela Safranina, sugerindo o predomínio de resíduos de natureza glicídica nas superfícies celulares, independente dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Todas as quatro amostras de *C. striatum* testadas apresentaram formas sésseis predominantemente coradas pela Safranina quando cultivadas em meio TSB sem adição de quelante ou FeSO<sub>4</sub> (Figuras 17 – 20). Conforme os dados apresentados na Tabela 11, os níveis resíduos de natureza glicídica nas superfícies celulares pareceram ser amostra-dependentes, conforme observado para a amostra MDR 2369 BR-RJ/PFGE-II, fracamente e moderadamente produtora de biofilme nas superfícies hidrofóbicas de plásticos Thermanox® e poliestireno, respectivamente. Adicionalmente, todas as quatro amostras de *C. striatum* testadas apresentaram formas sésseis predominantemente coradas pela Safranina, biofilme formado em condições independente das concentrações de ferro utilizadas.

Nas Figuras 17 – 20 foram apresentadas as fotomicrografias que evidenciaram a produção de matriz extracelular em biofilmes maduros formados na superfície de lamínulas Thermanox® quando cultivadas em meio TSB sem adição de quelante ou FeSO<sub>4</sub> pelas quatro amostras de *C. striatum* testadas, porém em intensidades variadas.

A análise pela técnica de microscopia óptica utilizando o método adaptado de coloração - Comassie Blue acompanhado de Safranina – demonstrou que a matriz extracelular dos biofilmes foi predominantemente corada pelo Comassie Blue (azul/roxo), que possui afinidade por moléculas de natureza proteica quando analisada todas as quatro amostras de *C. striatum* cultivadas em meio TSB sem adição de quelante ou FeSO<sub>4</sub>. Adicionalmente, material de origem proteica foi o principal componente da matriz de biofilme formados em superfícies de lamínulas Thermanox® produzidos em condições de limitação e de suplementação de ferro por todas as

amostras de *C. striatum* testadas. Durante a formação de biofilme na superfície de lâminulas Thermanox®, as amostras de *C. striatum* mantiveram as superfícies celulares de natureza polissacarídica, propriedades autoagregativas e produção de “slime” de natureza proteica independente das concentrações de ferro testadas.

Figura 17 - Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lâminulas Thermanox® formado pela amostra *Corynebacterium striatum*

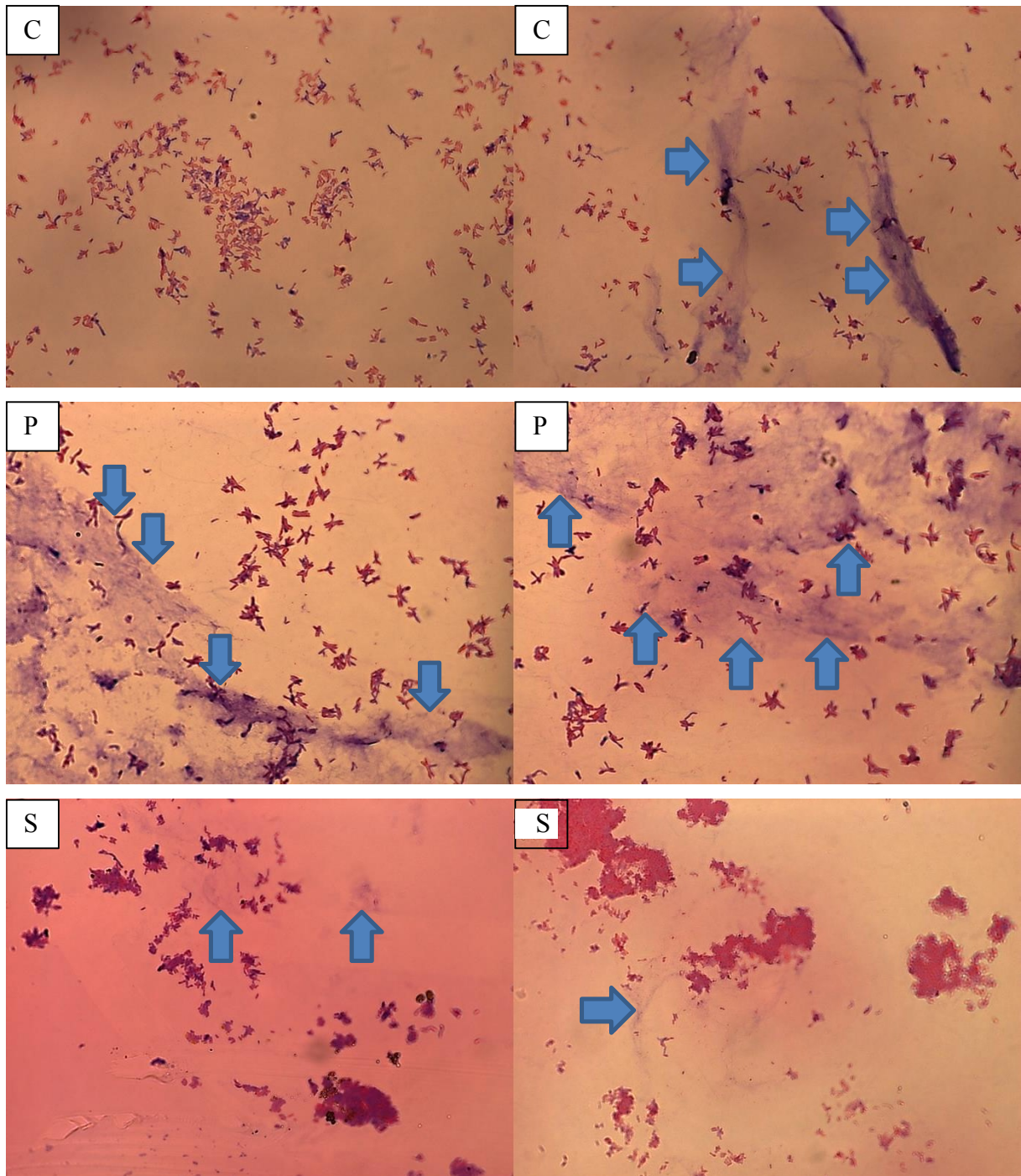


Legenda: Avaliação pela técnica de microscopia óptica utilizando o método adaptado de coloração - Comassie Blue (azul/roxo) e Safranina (rosa/vermelho) para detecção de componentes bacterianos de natureza proteica e sacarídica, respectivamente: matriz extracelular predominantemente corada pelo Comassie Blue (setas) e células sésseis coradas pela Safranina em diferentes concentrações de ferro: (C) condição controle, (L) limitação de ferro, (S) suplementação de ferro.

Fonte: O autor, 2021.



Figura 18 - Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lâminulas Thermanox® formado pela amostra *Corynebacterium striatum* MDR 2369BR-RJ/PFGE-II

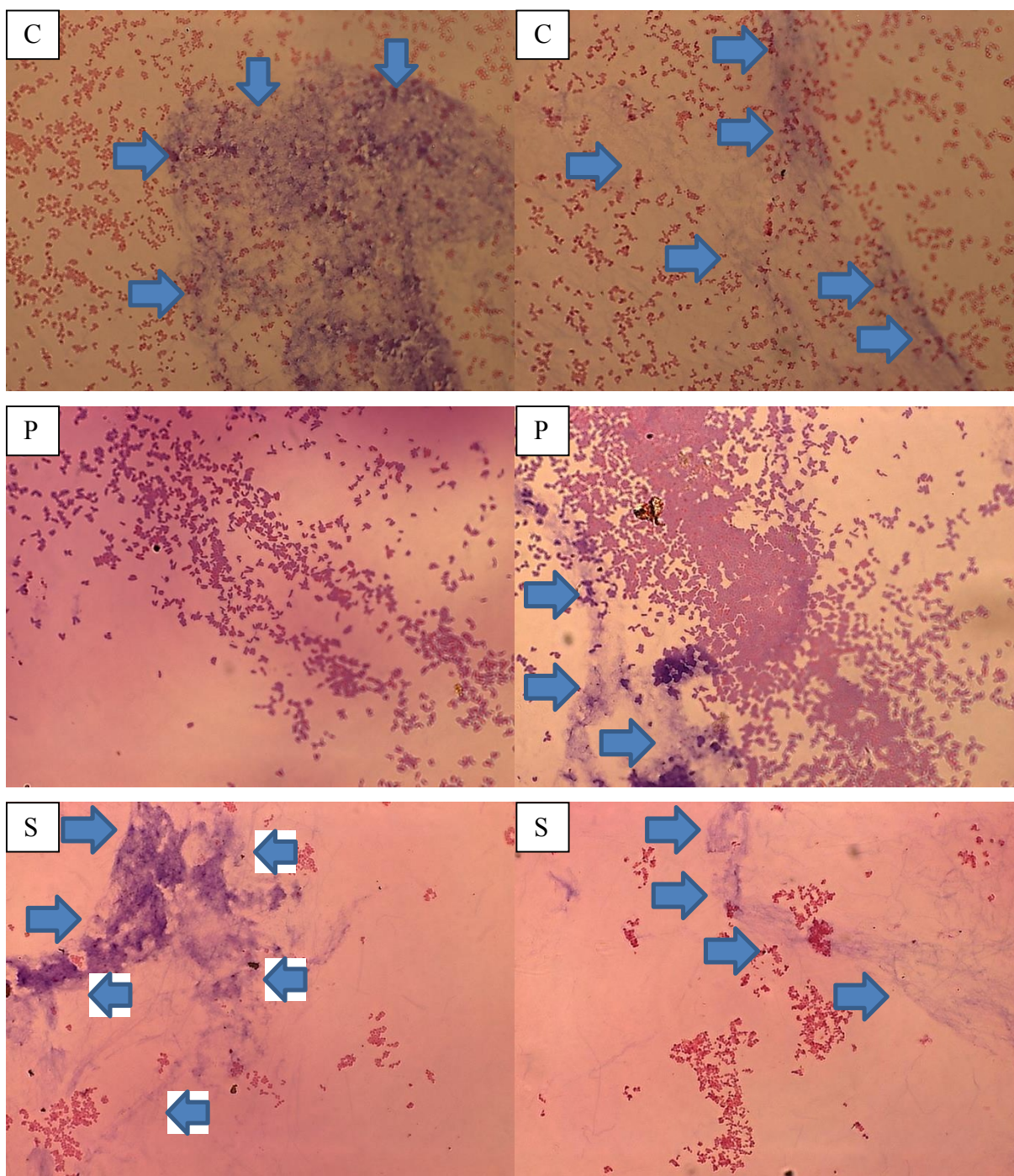


Legenda: Avaliação pela técnica de microscopia óptica utilizando o método adaptado de coloração - Comassie Blue (azul/roxo) e Safranina (rosa/vermelho) para detecção de componentes bacterianos de natureza proteica e sacarídica, respectivamente: matriz extracelular predominantemente corada pelo Comassie Blue (setas) e células sésseis coradas pela Safranina em diferentes concentrações de ferro: (C) condição controle, (L) limitação de ferro, (S) suplementação de ferro.

Fonte: O autor, 2021.



Figura 19 - Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lâminulas Thermanox® formado pela amostra *Corynebacterium striatum* MDS 1961BR-RJ/PFGE-III

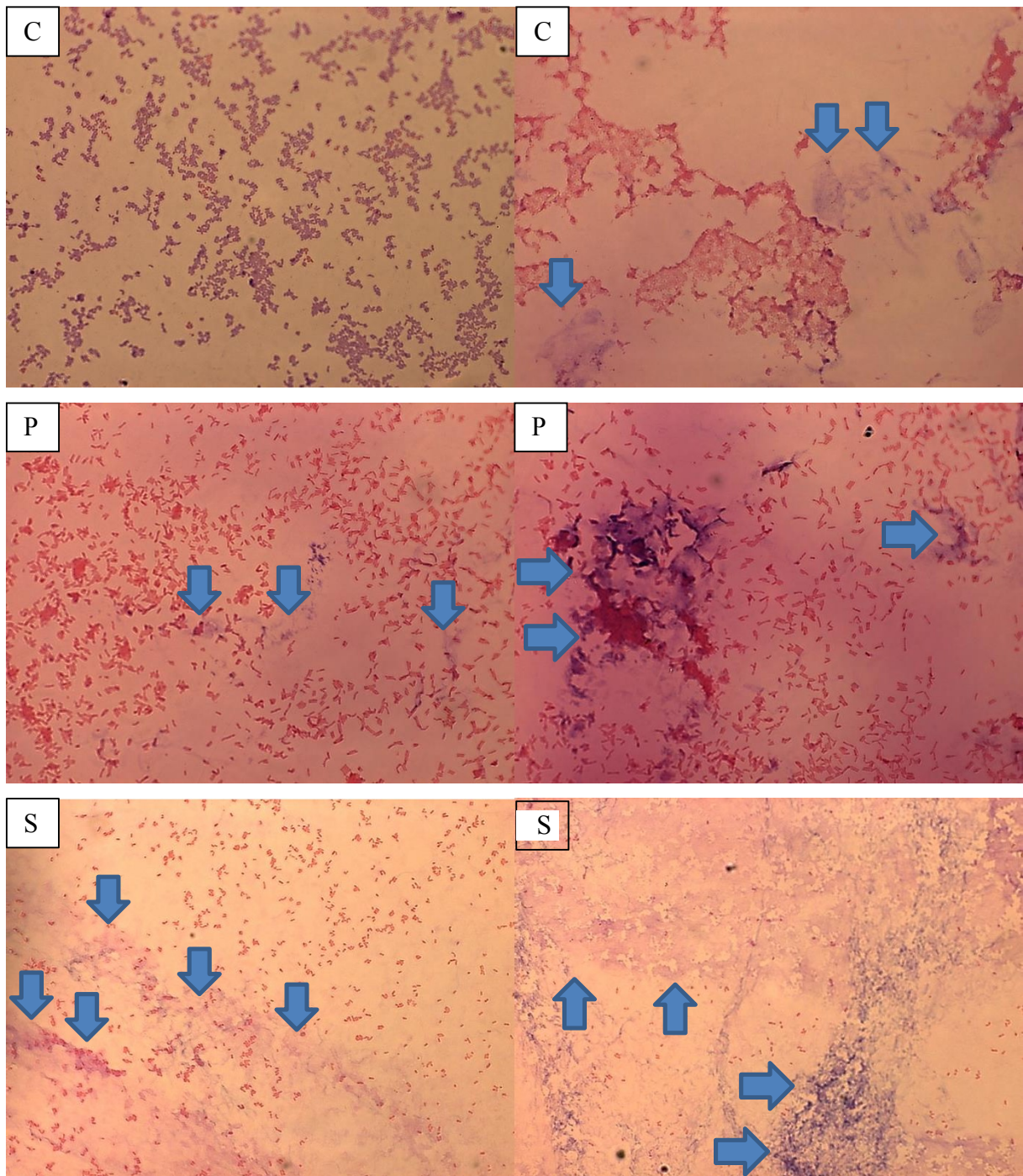


Legenda: Avaliação pela técnica de microscopia óptica utilizando o método adaptado de coloração - Comassie Blue (azul/roxo) e Safranina (rosa/vermelho) para detecção de componentes bacterianos de natureza proteica e sacarídica, respectivamente: matriz extracelular predominantemente corada pelo Comassie Blue (setas) e células sésseis coradas pela Safranina em diferentes concentrações de ferro: (C) condição controle, (L) limitação de ferro, (S) suplementação de ferro.

Fonte: O autor, 2021.



Figura 20 - Aspectos morfo-tintoriais da natureza do biofilme em lamínulas Thermanox® formado pela amostra *Corynebacterium striatum* MDS 1954BR-RJ/PFGE-IV



Legenda: Avaliação pela técnica de microscopia óptica utilizando o método adaptado de coloração - Comassie Blue (azul/roxo) e Safranina (rosa/vermelho) para detecção de componentes bacterianos de natureza proteica e sacarídica, respectivamente: matriz extracelular predominantemente corada pelo Comassie Blue (setas) e células sésseis coradas pela Safranina em diferentes concentrações de ferro: (C) condição controle, (L) limitação de ferro, (S) suplementação de ferro.

Fonte: O autor, 2021.

#### 4 DISCUSSÃO

Até o presente momento, poucos trabalhos descritos na literatura investigaram os efeitos de condições ambientais, incluindo condições de limitação de ferro nas atividades biológicas de outras espécies de corinebactérias relacionadas com processos infecciosos em humanos (MOREIRA et al. 2003). Deste modo, os resultados do presente estudo demonstraram a influência de variações do meio ambiente nos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e na patogenicidade de diversas de amostras clínicas pertencentes a diferentes pulsotipos (PFGE - I a X) de *C. striatum*.

Foi avaliada a capacidade de resistência a 21 antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por bacilos Gram-positivos em ambientes hospitalares e, em seguida, avaliamos a capacidade da produção de biofilme, bem como a influência do ferro nestes processos em amostras de *C. striatum* isoladas do surto nosocomial e após o surto no Rio de Janeiro. Os dados demonstraram a prevalência de cepas MDR de *C. striatum* BR1987/I e BR2369/II, BR2130/V, BR2237/VI, BR2296/VII, BR2103/VIII e BR2425/IX que apresentaram resistência a quase todos os agentes antimicrobianos testados, apresentando sensibilidade apenas à linezolida, tetraciclina e vancomicina, bem como de cepas sensíveis (BR1961/III e BR1954/IV) apresentando resistência apenas à mupirocina, fosfomicina e ticarcilina/clavulanato e BR2376/X apresentando sensibilidade apenas à ampicilina e tetraciclina, conforme observado por outros autores (HAWKEY, 1988; RUSSELL, 1990).

Segundo Dickinson e colaboradores (2001), clones MDR de *C. striatum* têm sido cada vez mais isolados em pacientes hospitalizados. Hahn e colaboradores, (2016) demonstram que a multirresistência a antimicrobianos tem sido frequente, mesmo em cepas de *C. striatum* isoladas de pacientes ambulatoriais atendidos em hospital universitário nos Estados Unidos, em estudo realizado durante o período de 2005 a 2014. Dados similares foram observados por Alibi e colaboradores (2017) para isolados oriundos de uma unidade hospitalar na Tunísia: 49,2% MDR - 31/63, no período de 2011 a 2014. Vale ressaltar que, *C. striatum* representou 70% (63/90) do universo de cepas relacionadas a infecções pertencentes ao gênero *Corynebacterium* neste período. Interessantemente, na Colômbia, Beltran-Arroyave e colaboradores (2016) encontraram cepas MDR de *C. striatum* sensíveis apenas à vancomicina, linezolida e daptomicina e relataram que já foram encontrados isolados com sensibilidade apenas à vancomicina.



Consistente com o relatado por Latorre e colaboradores (2018) para *Enterococcus faecalis* e *Pasteurella multocida*, que perceberam que alterações de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos também podem ser induzidas por alterações nos níveis de ferro no meio de crescimento, sendo estas alterações resultantes da expressão diferencial do gene regulador de captação férrica (Fur), o qual está implicado na expressão global de diversas outras proteínas não relacionadas diretamente ao metal, observamos que as alterações nos níveis de ferro realizadas neste trabalho produziram mudanças nos perfis de susceptibilidade a diversos antimicrobianos, sobretudo à moxifloxacina, da classe das fluoroquinolonas, que atua inibindo as enzimas envolvidas na replicação do DNA bacteriano (TRABULSI et al., 2015). Ela mostrou-se eficaz contra as cepas I, II, V, VI e VIII, até então resistentes à sua atividade, tanto após o tratamento com limitação de ferro quanto após o tratamento com suplementação de ferro. A cepa BR2376/X, que, até então, era resistente somente a tetraciclina e ampicilina, se tornou resistente a outros sete antimicrobianos (limitação de ferro) e seis antimicrobianos (suplementação de ferro), adquirindo um perfil MDR. Deste modo, todas estas alterações evidenciam, ainda mais, a influência do regulador da captação férrica (Fur) sobre o metabolismo global bacteriano.

A capacidade de formar biofilmes pode ser um pré-requisito para a patogênese de doenças nosocomiais. Biofilmes são encontrados em inúmeros dispositivos médicos (por exemplo, cateteres venosos centrais, cateteres urinários, sistemas de hemodiálise, endoscópios, marca-passos, lentes de contato). Sua presença pode ter sérias implicações para pacientes imunocomprometidos e pacientes que têm dispositivos médicos de longa permanência (RUTALA et al., 2008).

Em todos os testes de avaliação de aderência a substratos abióticos, independente da carga, foi verificada a capacidade de produzir biofilme para as cepas de *C. striatum* analisadas, assim como relatado anteriormente para outras corinebactérias, incluindo *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. amycolatum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. glutamicum*, *C. renale* e *C. matruchotii* (OLSON et al., 2002; SORIANO et al., 2009; GOMES et al., 2009; SOUZA et al., 2015a, GOMES et al., 2013; CHANDRAN et al., 2016), reiterando a importância da produção de biofilme para a patogênese das corinebactérias produtoras e não produtoras de toxina diftérica. Nossos resultados sugerem que *C. striatum* pode utilizar essa habilidade para persistir sobre dispositivos invasivos, instrumentos, utensílios e aparelhos e causar surtos em ambientes hospitalares.

Os cateteres intravasculares são indispensáveis na prática da medicina moderna, particularmente em UTIs sendo, no entanto, importante fonte de infecção da corrente

sanguínea primária. Aproximadamente 150 milhões de cateteres são utilizados a cada ano nos hospitais e clínicas dos Estados Unidos, sendo mais de 5 milhões de cateteres venosos centrais. Os avanços tecnológicos favoreceram a manutenção de acesso vascular de longa permanência e com maior frequência de uso, acarretando, por conseguinte, o aumento de infecções relacionadas a esse procedimento (APECIH; 2005). Os hospitais do Sistema Nacional de Vigilância das Infecções nosocomiais relatam que muitas infecções hospitalares são relacionadas ao uso de dispositivos invasivos, como cateteres (ENI; EDGAR, 2007; MCGEE; GOULD, 2003). O risco de infecção, devido ao acesso vascular, está associado a diversos procedimentos e fatores, tais como: à localização do acesso, solução infundida, experiência do profissional que realiza o procedimento, tempo de permanência, tipo e manipulação do cateter, entre outros. Esses fatores constituem pontos estratégicos importantes para ações preventivas dessas infecções. Embora a incidência de infecção da corrente sanguínea seja mais baixa que as outras infecções hospitalares (IH) como as pneumonias, infecções do trato urinário e aqueles do sítio cirúrgico, a infecção da corrente sanguínea tem sua importância por ser causa de substancial morbidade, mortalidade e elevação dos custos hospitalares (ROSENTHAL et al., 2003; FERNANDES, et. al., 2000). A problemática se consolida nos resultados apresentados, que demonstraram que todas as amostras de *C. striatum* testadas revelaram capacidade significativa de produção de biofilme em poliuretano, fato que foi comprovado tanto através de ensaios qualitativos (rolamento de fragmento de cateter conforme proposto em 1977 por Maki e colaboradores) quanto quantitativos (contagem de bactérias sésseis viáveis).

Em biofilmes, a resistência a antimicrobianos parece depender de estratégias multicelulares e da influência da matriz extracelular sobre os agentes dispersos no ambiente (STEWART e COSTERTON, 2001). A natureza do biofilme e sua estrutura podem ser responsáveis pela resistência a agentes antimicrobianos; tal resistência pode ser explicada por diversos mecanismos incluindo redução da penetração do agente no biofilme e mudanças nas taxas de crescimento e na fisiologia das células sésseis ao longo da formação e amadurecimento do biofilme (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Narten e colaboradores (2011) reiteram que a tolerância a antimicrobianos de células sésseis do biofilme é maior que aquela observada para células planctônicas (MAH e O'TOOLE, 2001; HOIBY et al., 2010) e demonstraram que a produção de biofilme produz aumento significativo (entre 20 e 75 vezes) da resistência à ciprofloxacina e tobramicina para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* associadas a infecções no trato urinário. A resistência aos agentes antimicrobianos de bactérias em biofilme contribui para a cronicidade das infecções, tais como

aquelas associadas com dispositivos médicos implantados (HAHN et al., 2016; CHANDRAN et al., 2016).

Uma vez que todas as cepas analisadas neste trabalho, independente do seu perfil de resistência, apresentaram capacidade de produção de biofilme, foi demonstrado que a resistência aos diferentes agentes antimicrobianos não é o único artifício usado por este patógeno para sobrevivência em ambientes onde há significativa pressão seletiva sobre as diversas cepas. Os resultados supracitados intensificam a preocupação acerca das IRAS, uma vez que, a produção de biofilme corrobora para a proteção de *C. striatum* contra agentes químicos externos.

Neste trabalho observamos a capacidade de *C. striatum* de interagir e aderir a superfícies abióticas diversas, incluindo poliuretano, poliestireno e vidro. O mesmo foi anteriormente descrito para outras corinebactérias, como *C. diphtheriae* e *C. pseudodiphtheriticum*. A afinidade pelo substrato e capacidade de produção de biofilme variou em intensidade e natureza bioquímica entre as espécies e cepas estudadas (GOMES, et al., 2009; SOUZA et al., 2015a; SOUZA et al., 2015b). Diversos fatores influenciam a fixação inicial às superfícies, como: tipo e propriedades do material da superfície; carga e microtopografia; características intrínsecas do microorganismo, como a carga, hidrofobicidade, presença de apêndices superficiais (por exemplo, pilinas, fimbrias, flagelos e cápsula), além da capacidade de produzir substâncias exopoliméricas (CERI, 1999; FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). Alguns agentes químicos, como antimicrobianos, enzimas proteolíticas, desoxirribonucleases e micronutrientes podem, de acordo com sua biodisponibilidade, modificar a produção de biofilme, conforme descrito anteriormente para outros patógenos humanos, como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. diphtheriae* (GOMES et al., 2009; KAPLAN, 2011; KAPLAN, 2012; NARTEN et al., 2012; CHANDRAN et al., 2016).

Silva e colaboradores (2013) informam que mutantes com deficiência de captação de ferro através de sideróforos apresentaram aumento na produção de biofilme em relação às cepas selvagens, indicando a participação deste microelemento na regulação de propriedades adesivas em *Burkholderia* spp.. Segundo Moreira e colaboradores (2003), o ferro pode também exercer papel regulatório sobre as propriedades adesivas de bacilos diftéricos. Para *C. diphtheriae* a restrição de ferro implicou na regulação da aderência e produção de slime como parte de uma resposta global a condições ambientais limitadas ferro que incluiu a desrepressão de genes para a síntese de citotoxinas e sideróforos e para transporte de complexos Fe (III)-sideróforo.

Dando continuidade à investigação das propriedades adesivas de *C. diphtheriae*, Moreira e colaboradores (2003) relatam mudanças nos padrões de aderência aos substratosabióticos e o aumento da hidrofobicidade para cepas fermentadoras de sacarose mediante a limitação de ferro e sugerem que este metal está envolvido no metabolismo e expressão de carboidratos de superfície das células bacterianas nessas corinebactérias. Salientando que *C. striatum* é uma corinebactéria fermentadora de sacarose, os resultados obtidos nos ensaios qualitativos nesta pesquisa reiteram os achados anteriormente relatados.

De forma similar, utilizando o modelo de limitação de ferro, inicialmente observamos redução da aderência às superfícies hidrofílicas (vidro) testadas, para a maioria das cepas através de análises qualitativas. Apesar disso, com a formação do biofilme maduro, *C. striatum* se mantém viável, até mesmo, multiplicando-se de uma forma mais rápida, uma vez que, as análises quantitativas demonstraram o aumento da viabilidade celular no biofilme maduro nestas condições. As cepas BR1987/I-MDR, BR2103/VIII-MDR e BR1961/III-MDS tiveram a maior contagem do número de viáveis, porém, para a cepa BR1961/III-MDS, isso não significou aumento na formação de biofilme nos ensaios qualitativos e semi-quantitativos. A cepa BR1954/IV-MDS, de grande hidrofobicidade e difícil homogeneização, apresentou-se fracamente aderente em todas as condições de crescimento a qual foi submetida, porém o número de células viáveis aumentou quando a cepa foi submetida à restrição de ferro. Aparentemente a cepa BR1987/I-MDR apresentou maior potencial de virulência, uma vez que revelou as maiores contagens de células sésseis viáveis em condições de limitação de ferro, similarmente ao observado nos processos infecciosos onde a biodisponibilidade de ferro é extremamente baixa, favorecendo a persistência desta cepa no hospedeiro, principalmente, em situações de comprometimento da integridade imunológica. Tais características colaboram para a maior prevalência deste pulsotipo observada durante o surto de relatado no HUPE/UERJ.

Nos ensaios semi-quantitativos pudemos observar que a capacidade de formar biofilme/aderir à superfície de poliestireno diminuiu diante da suplementação de ferro, o que foi observado em três das nove cepas estudadas. Concomitantemente observamos a redução da viabilidade celular para uma dessas cepas. Resultados similares foram anteriormente descritos para *E. faecalis* (LATORRE et al., 2019), *H. influenzae* (HARRISON et al., 2012), *Yersinia enterocolitica* (HÖPFNER et al., 2001), *Vibrio vulnificus* (BARTON & ACTON, 2009) e *Listeria monocytogenes* (GALAN et al., 2011), cuja virulência é aumentada em condições onde há maior disponibilidade de ferro.

A presença de resíduos orgânicos na superfície de materiais hospitalares ocorre com

frequência elevada, seja pela sua implantação no paciente (dispositivos invasivos, próteses, implantes entre outros) seja pela contaminação com secreções corpóreas (sangue, muco, líquido cefalorraquidiano, líquido sinovial, pus, catarro etc.) durante seu uso, como sucede para instrumentos cirúrgicos, laringoscópios, laparoscópios, espéculos e outros. Tal condição garante a disponibilidade de micronutrientes que podem influenciar a produção de biofilme e colaborar para a persistência de patógenos e para a disseminação de IRAS.

Segundo Becker e Skaar (2014), metais são cofatores requeridos para numerosos processos bioquímicos essenciais para o metabolismo celular, tanto para os patógenos quanto para o hospedeiro, participando de processos incluindo geração de energia, transferência de elétrons, replicação e transcrição de ácidos nucleicos. Contudo, muitos metais de transição, como o ferro, são tóxicos em altas concentrações, isso se deve à sua habilidade de participar como catalisadores em reações de oxirredução ou por se ligarem indevidamente a metaloproteínas, inativando suas funções. Harrison e colaboradores (2012) e Caza e Kronstad (2013) afirmam que o íon ferroso é um metal tóxico em altas concentrações, pois favorece a formação de radicais hidroxila através de reações de Fenton e/ou Haber-Weiss, podendo danificar membranas lipídicas, proteínas e DNA bacterianos. Asad e Leitão (1991) constataram que o tratamento prévio de *E. coli* com quelantes de metais, dentre eles, principalmente, os quelantes de ferro, protege as células contra os efeitos letais do  $H_2O_2$ , confirmando o papel do ferro na geração de radicais OH dentre outras espécies reativas de oxigênio. Essas afirmações estão em acordo com os resultados deste trabalho, no qual observamos a diminuição da formação de biofilme quando as cepas foram submetidas a crescimento em meio enriquecido com sulfato ferroso, inclusive com redução da contagem de bactérias sésseis viáveis.

Nas análises por microscopia, observamos, para todas as cepas testadas, um alongamento celular/filamentação, resultante do tratamento com quelante de ferro, devido à limitação de ferro. Este comportamento pode ser justificado, em parte, como uma resposta a uma situação de estresse (YUE et al. 2018), neste caso, a limitação de ferro. Liu e colaboradores (2018) relataram filamentação extensiva e outras alterações morfológicas e metabólicas induzidas pelo tratamento com concentrações subinibitórias de ceftazidima e cefalotina de cepas de *E. coli* oriundas de mastite bovina, além de aumento da resistência a (outros) antimicrobianos.

Segundo Yue e colaboradores (2018) a plasticidade morfológica tem sido historicamente um fator de virulência aumentada entre fungos patogênicos, permitindo uma adaptação rápida a ambientes em mudança. Ainda segundo o autor, células filamentosas são melhores em invadir os tecidos do hospedeiro para iniciar uma infecção sistêmica. Resultados

semelhantes foram encontrados por Schmidt e colaboradores (2018) para *Burkholderia pseudomallei*. Quando submetida à limitação de ferro, essa bactéria foi capaz de alterar sua morfologia da mesma forma que pudemos constatar para *C. striatum* neste trabalho. *B.pseudomallei* também foi capaz de alterar sua morfologia quando submetida a altos níveis de ferro, passando de um aspecto semelhante a bastonete para cocóide, o oposto da morfologia observada durante a limitação de ferro. Os comportamentos dos biofilmes mostrados no estudo chamam atenção das equipes de saúde, pois todas as amostras de cada pulso tipo testadas mantêm formas sésséis viáveis na presença ou na ausência de ferro.

O entendimento dos fatores que corroboram para a persistência de *C. striatum* nos processos infecciosos e em ambientes nosocomiais pode subsidiar o desenvolvimento de estratégias para a prevenção, monitoramento e o controle das infecções por este agente. Diante deste panorama, estudos adicionais acerca de fatores que influenciam os atributos de virulência e de sua relevância para a patogenia de corinebactérias permanecem necessários, na tentativa de minimizar o envolvimento de *C. striatum* como agente etiológico de IRAS.

## CONCLUSÕES

Os resultados da investigação da habilidade de formação de biofilme e da influência de diferentes concentrações de ferro sobre formas celulares sésseis de *C. striatum* permitiram concluir que:

- a) Cepas representantes dos pulsotipos de maior prevalência (pulsotipos I e II) no surto registrado no HUPE/UERJ e após o surto (pulsotipos V, VI, VII, VIII e IX) apresentaram perfis de multirresistência frente aos 21 antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por bacilos Gram-positivos, permanecendo sensíveis apenas aos antimicrobianos vancomicina, linezolida e tetraciclina, enquanto que as demais cepas (pulsotipos III, IV e X) apresentaram-se sensíveis. Essa diversidade de comportamentos reafirma a importância da realização de testes de susceptibilidade nas infecções por *C. striatum* e do monitoramento deste agente nos ambientes nosocomiais;
- b) Tanto a limitação de ferro quanto a suplementação de ferro promoveram alterações nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos. Mais evidentemente, ambas as condições tornaram as cepas: BR1987/I-MDR, BR2369/II-MDR, BR2130/V-MDR, BR2237/VI-MDR e BR2103/VIII sensíveis à moxifloxacina; as cepas BR2130/V-MDR, BR2296/VII-MDR e BR2425/IX-MDR sensíveis a rifampicina; e a cepa BR2376/X-S multirresistente (MDR) demonstrando que existe uma regulação da sensibilidade aos antimicrobianos mediada pelo ferro;
- c) Todas as cepas analisadas foram capazes de aderir e produzir biofilme em todos os substratos testados, sugerindo que estes atributos de virulência são conservados na espécie e reiterando a importância deste agente como contaminante de materiais de uso hospitalar, independente da sua susceptibilidade aos antimicrobianos;
- d) A limitação de ferro promoveu mudanças nos perfis de aderência e redução da produção de biofilme em vidro e poliestireno, demonstrando que este micronutriente modula propriedades adesivas de *C. Striatum*;
- e) A viabilidade de células sésseis nos biofilmes produzidos em poliestireno sob condições de limitação de ferro revelou aumento significativo para a maioria das cepas analisadas, indicando que a produção de biofilme representa um

importante mecanismo de autopreservação para *C. striatum* durante os processos infecciosos quando a biodisponibilidade de ferro é estritamente regulada pelo hospedeiro;

- f) Com exceção do observado para a cepa BR1954/IV-S, a suplementação de ferro promoveu a redução da produção de biofilme e aumento da viabilidade bacteriana de células sésseis. De modo geral, a presença de altas concentrações de íons ferrosos foi documentada como sendo tóxica para as células bacterianas, contudo, o aumento da viabilidade celular para essa cepa indica que *C. striatum* pode utilizar mecanismos para neutralizar os efeitos tóxicos deste elemento, podendo persistir em materiais hospitalares mesmo na presença de resíduos orgânicos ricos em ferro;
- g) As imagens de microscopia de luz demonstraram que a natureza da matriz secretada não é influenciada pela concentração de ferro no meio, sendo ela de natureza, majoritariamente proteica em todas as condições para todas as cepas analisadas;
- h) As imagens de microscopia eletrônica revelaram que a limitação de ferro promove a filamentação/alongamento celular em *C. striatum*, demonstrando, ser este, um dos fatores estressantes que levam a esse fenótipo, ao modular as propriedades morfológicas;
- i) *C. striatum* é capaz de reverter o fenótipo filamentosos/alongado ao retornar à condição de crescimento em meio com quantidade de ferro usual, e esta plasticidade morfológica pode ser considerada um fator de virulência ao permitir uma rápida adaptação a ambientes em mudança;
- j) Os dados enfatizam que *C. striatum* não deve ser subestimado ou negligenciado e descartado como mero contaminante pelos profissionais da saúde tanto nos países industrializados quanto nos países em desenvolvimento.

O estímulo à pesquisa precisa ser revigorado por todas as instâncias sociais e acadêmicas porque há muito a ser buscado, entendido, processado e aplicado em prol da saúde no Brasil. As IRAS são desafios constantes para os pesquisadores e devem ser prioridades permanentes para os gestores da saúde a fim de que o sonho de minimizar as infecções nosocomiais comece a redesenhar a realidade brasileira.



## REFERÊNCIAS

ADDERSON, E. E.; BOUDREAUX, J. W.; HAYDEN, R.T. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Ped. Infec. Dis J.* 27: 136 - 41. 2008.

ALMUZARA MN, MIER DE C, RODRIGUEZ C.R., FAMIGLIETTI A.M.R., VAY C.A. Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para La identificación de bacilos gram-positivos difteróides de importância clínica. *Revista Argentina de Microbiologia.* 2006; 38: 197 - 201.

ANVISA. Controle de Infecção em Serviços da Saúde. ANVISA, 2014. Disponível em: <http://www.ANVISA.gov.br/servicosade/controle/legis.htm>>. Acesso em 04 jan. 2021.

ANVISA. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar. In: Caderno C Métodos de Proteção Anti-infecciosa. Brasil, 2000. 84 p. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf>>. Acesso em 04 jan. 2021.

ANVISA. Disponível em: [http://www.ANVISA.gov.br/servicosade/controle/reniss/manual%20\\_controle\\_bacterias.pdf](http://www.ANVISA.gov.br/servicosade/controle/reniss/manual%20_controle_bacterias.pdf). 2007. Acesso em: 15 mai. 2021.

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

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR (APECIH). Infecção Relacionada ao uso de Cateteres Vasculares. São Paulo (SP). Disponível em: [www.apecih.org.br/informe-técnico/125](http://www.apecih.org.br/informe-técnico/125). Acesso em: 15 out 2021

ARCIOLA, C.R. et al. Etiology of implant orthopedic infections: A survey on 1027 clinical isolates. *Int. J Artif Organs.*; 28:1091-1100.2005.

ASAD, N.R. & LEITÃO, A.C. Effects of metal ion chelators on DNA strand breaks and inactivation produced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli*: detection of iron-independent lesions. *Journal of Bacteriology*, 1991. 173(8): 2562-2568.

BAIO PV, MOTA HF, FREITAS AD, GOMES DL, RAMOS JN, SANT'ANNA LO, SOUZA MC, CAMELLO TC, HIRATA JRR, VIEIRA VV, MATTOS-GUARALDI AL. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2013; 108:63-98.

BAUER W, KIRBY W M, SHEERRIS JC, TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Americ. J Clinic Pat.* 1966; 45: 493-496.

BELMARES, J. *Corynebacterium endocarditis* species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infectious Diseases, USA*; 7, 2: 1-8. 2007.

BETETA LA, RUIZ MTG, PRADO LV, OLIVARES MF 2009. Cystitis and haematuria due to *Corynebacterium Striatum*. A case report and review. *Actas Urológicas Españolas*

BHANDARI S, MEIGH JA, SELLARS L. CAPD peritonitis due to *Corynebacterium striatum*. *Perit Dial Int*. 1995; 15: 88 - 9.

BOLTIN, D., KATZIR, M., BUGOSLAVSKY, V., YALASHVILI, I., BROSH-NISSIMOV, T., FRIED, M., AND ELKAYAM, O. (2009). *Corynebacterium striatum* - a classic pathogen eluding diagnosis. *Eur. J. Intern. Med.* 20, e 49-e52.

BONIFAIT, L.; GRIGNON, L.; GRENIER, D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Env. Microbiol.*; 74: 4969-4972.2008.

BORSETTI, F.; TREMAROLI, V.; MICHELACCI, F.; BORGHESE, R.; WINTERSTEIN, C.; DALDAL, F.; & ZANNONI, D. Tellurite effects on *Rhodobacter capsulatus* cell viability and superoxide dismutase activity under oxidative stress conditions. *Research in Microbiology*, 2005. 156: 807-813.

BRANDENBURG, A. H., A. VAN BELKUM, C. VAN PELT, H. A. BRUINING, J. W. MOUTON, AND H. A. VERBRUGH. 1996. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 34:2089–2094.

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

CAMELLO, T.C.F., MATTOS-GUARALDI, A.L., FORMIGA, L.C.D. AND MARQUES, E.A. (2003) Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol* 34, 39-44.

CATTONY, E.B.M., CHINALIA F.A., RIBEIRO R, ZAIAT M., FORESTI E., VARESCHEM. B.A. Ethanol and Toluene Removal in a Horizontal-Flow Anaerobic Immobilized Biomass Reactor in the Presence of Sulfate. Published online 24 May 2005 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/bit. 20509

CAMELLO, TCF. *Corynebacterium* spp. e outros micro-organismos corineformes de importância médica. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2008. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas.

CAMPANILE, F, CARRETTO E, BARBARINI D, GRIGIS A, FALCONE M, GOGLIO A, VENDITTI, M, STEFANI S. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains. *Emerg. Infec. Dis.* 2009; 15: 75-78.

CAZA & KRONSTAD. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and

fungal pathogens of humans. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2013 Nov 19; 3:80. doi: 10.3389/fcimb.2013.00080. eCollection 2013.

CERI H, OSLAN M, MORK D, STOREY D, READ R, BURET A, OSLAN B. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocid susceptibility testing. *Methods in Enzymology.* 2001; 337: 377-385.

CHANDRAN R, PUTHUKKICAL DR, SUMAN E, MANGALORE K. Diphtheroids-important nosocomial pathogens. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2016; 10(12): DC28-DC31.

CHATZOPOULOU M, KOUFAKIS T, VOULGARIDI, GABRANIS I, TSIKALOU M. A case of fatal sepsis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*. *Hippokratia.* 2016; 20(1): 67-69.

CLARRIDGE, J.E., AND SPIEGEL, C.A. 1995. *Corynebacterium* and miscellaneous gram positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*, p. 357-378.

MURRY, P., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., AND YOLKEN, R.H. (eds), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. M100. S 25.1-56238-607-7- 2013.

CONE LA, et al. Septic synovitis and arthritis due to *Corynebacterium striatum* following an accidental scalpel injury. *Clin. Infect. Dis.* Dec 1998; 27(6): 1532–3.

COSTA MJ, MONTEIRO , OLIVEIRA-NETO AL, RANTIN FT, KALININ AL. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology.* 2008 Apr; 17(3): 153-63. Epub 2007 Nov 7.

COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER D R., LAPPIN-SCOTT HM. Microbial biofilms. *Annual. Rev. Microb.* 1995; 49: 711-745.

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

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

CREAGH, R., J. M. SAAVEDRA, F. J. RODRIGUEZ, P. RODRIGUEZ, AND D. MERINO. 2000. Pneumonia caused by *Corynebacterium striatum* in a patient with AIDS. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 18:297–298.

DAI LEE & WONG Effects of Iron Limitation on Production of a Siderophore, Outer Membrane Proteins, and Hemolysin and on Hydrophobicity, Cell Adherence, and Lethality for Mice of *Vibrio parahaemolyticus* Infection and immunity, July 1992, p. 2952-2956 0019-9567/92/072952-05\$02.00/0

DALL, L., BARNES, W. G., AND HURFORD, D. (1989). Septicaemia in a granulocytopenic patient caused by *Corynebacterium striatum*. *Postgrad. Med. J.* 65, 247-248

DEIGHTON & BORLAND. Regulation of Slime Production in *Staphylococcus epidermidis* by Iron Limitation *INFECTION AND IMMUNITY*, Oct. 1993, p. 4473-4479 0019-9567/93/104473-07\$02.00

DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(2):167-193.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease*, 2002. 8(9):881-890.

DOOLEY, D. P. et al. Validation of catheter semiquantitative culture technique for non-staphylococcal organisms. *J Clin. Microb.* 34: 409-412.1996.

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

ENI, S.; EDGAR, N.; ROSA, G.; AIRES, A. B.; BORBA, P. H.; MESIANO, J.; MERCHÁN-HAMANN, T. Infecções da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva, *Rev. Latino Americana Enf.*; 15: 3-2007.

EUZÉBY JP. List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN). 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 23 de setembro. 2021.

FERNÁNDEZ-AYALA M, NAN DN, FARIÑAS MC. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. *Am. J Med.* 2001; 110:167.

FRANSON, T. R.; SHETH, N. K.; ROSE, H. D.; SOHNLE, P. G. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J. Clin. Microb.* 20: 500–505-. 1984.

FUNKE G, BERNARD K A. Coryneform Gram-Positive Rods. In: Versalovic J. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th. Washington, United States of America: Ed. ASM Press, 2011; 413-471.7.

FUNKE G, VON GRAEVENITZ A, CLARRIDGE JE, BERNARD K A. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microb.* 1997; 10: 125-159.

GIUNTA, A. P. N.; LACERDA, R. A. Inspeção dos Programas de Controle de Infecção Hospitalar dos Serviços de Saúde pela Vigilância Sanitária: diagnóstico de situação. *Revista da Escola de Enfermagem da USP, Brasil*, v. 40, n. 1, p. 64-70, 2006.

GOMES D. L. R.; MARTINS C. A. S.; SANTOS L. S. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J. Med. Microb.* 58: 1419-27.2009.

HALLIWELL, B. & CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, 1994. 102(10): 5-12.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford (University Press), 3a edição, 1999.

HARTMANN M. et al. Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy. Antimicrobial agents and chemotherapy, Aug. 2010, p. 3132–3142 0066-4804/10/\$12.00 doi:10.1128/AAC.00124-10

HEDGE, A.; BHAT, G.H. & MALLYA, S. Effect of exposure to hydrogen peroxide on the virulence of *Escherichia coli*. Indian Journal of Medical Microbiology, 2008. 26(1): 25-28.

HEIDEMANN D. G, DUNN S. P, DISKIN J. A., AIKEN TB. *Corynebacterium striatum* keratitis. Cornea. 1991; 10:81-2.

HIRATA R JR, PEREIRA GA, FILARDY AA, GOMES DLR, DAMASCO PV, ROSA ACP, NAGAO PE, PIMENTA FP, MATTOS-GUARALDI AL. Potential pathogenic role of aggregative adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. Braz. J. Med. Biol. Res. 2008; 41: 986–991.

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

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

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

KHAMIS A R., RAOULT D, LA SCOLA B. RpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(9): 3925-3931.

LATORRE, M., QUENTI, D., TRAVISANY, D., SINGH, K. V., MURRAY, B. E., MAASS, A., CAMBIAZO, V. 2018. The role of Fur in the transcriptional and iron homeostatic response of *Enterococcus faecalis*. Frontiers in microbiology. 9:1580. doi: 10.3389/fmicb.2018.01580

LEONARD, R. B., D. J. NOWOWIEJSKI, J. J. WARREN, D. J. FINN, AND M. B. COYLE. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. J. Clin. Microbiol.1994. 32:164–169.

LIU, G., DING, L., HAN, B., PIEPERS S., NAQVI, S. A., ALI, H. W. B. T., Vliegheer, S. D., XU, S., GAU, J. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis exposed to subminimum inhibitory concentrations of cefalotin or ceftazidime. Hindawi BioMed Research International Volume 2018, Article ID 4301628, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2018/4301628>

NUDEL K. et al. Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen of immunocompromised patients. Clin. Microbiol. Infect. 2018 Sep; 24(9): 1016.e7- 1016.e13.

MAGIORAKOS 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 Mar; 18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570 x. Epub 2011 Jul 27.

MAKI D. G, WEISE C. E, SARAFIN H. W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. The New Engl. J Med. 1977; 296: 1305-1309.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; ORTEGA, M. C.; AND SUAREZ, A. I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. J. Clin. Microbiol. 33: 1318-1321. 1995.

MARTIN, M. C.; et al. Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. J. Med. Microb.; 52: 599-602. 2003.

MARTINS CAS, FARIA LMD, SOUZA MC, CAMELLO TCF, VELASCO E, HIRATA R. JR, THULER LCS, MATTOS-GUARALDI AL. Microbiological and host features associated with corneal bacteriosis in cancer patients: a five-years study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104: 905-913.

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

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; ANDRADE, A. F. B. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and non-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. Cur. Microb. 38: 37-42. 1999.

MOHAMED, E. O.; MILLER, R. O. Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. Microbiol. 65: 2025-2031. 1999.

MEKALANOS, J.J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. Journal of Bacteriology, 1992. 174:1-7.

MOORE, K., HALL, V., PAUL, A., MORRIS, T., BROWN, S., MCCULLOCH, D., RICHARDSON, M. C., AND HARDING, K. G. (2010). Surface bacteriology of venous leg ulcers and healing outcome. J. Clin. Pathol. 63, 830-834.

MOREIRA, L. O.; et al. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. Appl. Env. Microb. 69: 5907–5913. 2003.

O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microb. 2000; 154: 49-79.

OLIVA A, BELVISI V, IANNETTA M, ANDREONI C, MASCELLINO MT, LICHTNER M, VULLO V, MASTROIANNI CM. Pacemakers lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. J. Clin. Microbiol. 2010; 48(12):4669-4671.

OLIVEIRA AC. Healthcare-associated infection: challenges in its prevention and control. Ver. Min. de Enf. 2009; 13(3): 445-450.

OTSUKA Y, OHKUSU K, KAWAMURA Y, BABA S, EZAKI T, KIMURA S. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2006; 54: 109- 114.

PEREIRA, G.A.; PIMENTA, F.P.; SANTOS, F.R.; DAMASCO, P.V.; HIRATA JR, R. & MATTOS-GUARALDI, A.L. Antimicrobial resistance among brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2008. 103 (5): 507-10.

PIMENTA, F.P., SOUZA, M.C., PEREIRA, G.A., HIRATA, R.JR., CAMELLO, T.C. & MATTOS-GUARALDI, A.L. (2008). DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. Lett. Appl. Microbiol.

QIUA, X. et al. A novel isothermal amplification-based method for detection of *Corynebacterium striatum*. Journal of Microbiological Methods. 2019; 164 – 105675

RAMOS J.N. et al.; Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from blood stream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018 Jul 10;113(9):e180051. doi: 10.1590/0074-02760180051.

RAMOS J.N. et al.; Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrugresistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. BMC Infectious Diseases (2019) 19:672 <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4294-7>

REDDY BS, CHAUDHURY A, KALAWAT U, JAYAPRADA R, REDDY GSK, RAMANA BV. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non diphtheriae *Corynebacterium* (Diphtheroids). Indian. J. Med. Microbiol. 2012; 30(1): 52-57.

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

RIEGEL, J. A. et al. Stimulation of fluid secretion of Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* Meig. by cyclic nucleotides of inosine, cytidine, thymidine and uridine. J. Exp. Biol.; 201: 3411–3418. 1998.

ROSSI CC. et al. CRISPR-Cas Systems Features and the Gene-Reservoir Role of Coagulase-Negative Staphylococci. Front. Microbiol. 2017; 8: 1545.

RUTALA W.A. APIC guidelines for selection and use of disinfectants. Am. J. Infect. Control. 1995; 23: 313-342.

RUTALA W.A, WEBER DJ, WOODS GL. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. 2008; acesso maio 2016 Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection>.

SANGAL V. et al. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. BMC Genomics. 2015 Oct 9;16:765

SANTOS C.S. et al. Efficient differentiation of *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium xerosis* clinical isolates by multiplex PCR using novel species-specific primers. Journal Microbiol. Methods. 2017 Nov; 142:33-35.

SANTOS L.S. Estudo sobre os efeitos do telurito de potássio em atividades biológicas do *Corynebacterium diphtheriae*. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica Humana.

SCHARFMAN A. et al. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to Respiratory Mucins and Expression of Mucin-Binding Proteins Are Increased by Limiting Iron during Growth Infection and immunity, Dec. 1996, p. 5417–5420

SCHMIDT I. H. E. et al. *Burkholderia pseudomallei* modulates host iron homeostasis to facilitate iron availability and intracellular survival. PLoS Neglected Tropical Diseases 2018;

SCHOLLE D.A. Spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum*. J. Clin. Microbiol 2007 Feb; 45(2):656–8.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O; VIEIRA, M. J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* Biofilms formed under different flow regimes. Water Science. And Tech.; 47, 5: 217-223. 2003.

SILVA-SANTANA et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976-2020. Archives of Microbiology. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02246-1>

SOUZA ACS, PEREIRA MS, RODRIGUES MAV. Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. Rev latino-am enf. 1998; 6(3): 95-105.

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

SOUZA MC. Atividade de biocidas e produção de biofilme em *Corynebacterium striatum*. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2014. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

SOUZA C, et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated



with nosocomial outbreak. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(2): 242-248.

SOUZA C, et al. Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2019 Sep;112(9):1331-1340.

SOUZA C, et al. Resistance to Antiseptics and Disinfectants of Planktonic and Biofilm-Associated Forms of *Corynebacterium striatum*. Microb Drug Resist. 2020 Dec;26(12):1546-1558.

STEPANOVIC S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J. Microb. 2000; 40: 175-179.

STEPANOVIC S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Journal Compilation 2007; APMIS ISSN 0903-4641

STEWART PS, COSTERTON JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lanc. 2001; 358: 135-138.

STONE N., GUILLET P, BURGE S. Breast abscess due to *Corynebacterium striatum*. Br J. Dermatol. 1997; 137:623

SUPERTI, S. V. et al. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 2009. 51, 115-116.

SUZUKI T. et al. Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. J. Clin Microb. 2007; 45: 3833-3836.

SYED M. A. et al., Recurrent Bacteremia with *Corynebacterium striatum* After Prosthetic Valve Replacement: A Case Report. Cureus 2019; 11(5): e4670.DOI 10.7759/cureus.4670

TARR, P. E. et al., MDR *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. Transplant. Infect. Dis. 2003. 5:53–58.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia.8. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F.; Microbiologia 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015

TRIVIER R.J. & COURCOL. Iron depletion and virulence in *Staphylococcus aureus* FEMS Microbiol. Lett. 1996 Aug 1;141 (2-3):117-27.

VERNEUIL, N. et al. J. Effects of the *Enterococcus faecalis* hypR gene encoding a new transcriptional regulator on oxidative stress response and intracellular survival within macrophages. Infectious and Immunity, 2004. 72(8): 4424-4431.

VU, T.; ALTMAN, A.; SHOHAM, Y. On the complexity of schedule control problems for knockout tournaments. In Proc. of AAMAS. 225–232. 2009.

WANG CC, MATTSON D, WALD A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman Catheters. *Bone Marrow Transplant*.2001; 27: 445-449.A.

WANG X et al., Whole-Genome sequencing reveals a prolonged and persistent intrahospital transmission of *Corynebacterium striatum*, an emerging Multidrug-resistant pathogen. *Journal of Clinical Microbiology* 2019; 57:e00683-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00683-19>.B

WEBB, S. J.et al. Further evidence for an abnormality in the temporal processing of faces in autism. Poster session presented at the Society for Research in Child Development, Tampa, FL. 2003.

WEISS K, et al. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* spp. *Clin. Infect. Dis.* Dec 1996; 23(6):1246-8.

WONG KY, CHAN YC, WONG CY. *Corynebacterium striatum* as an emerging pathogen, *J Hosp. Infect* 2010; 76:371-372.

YUE H. et al., Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerging Microbes & Infections* ( 2018) 7:188 DOI 10.1038/s41426-018-0187-x

## APÊNDICE – Produção científica no período do mestrado

### Artigos completos publicados em periódicos

SOUZA, CASSIUS DE ; FARIA, YURI VIEIRA ; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; **FELIPE DE OLIVEIRA CABRAL** ; SILVA-SANTANA, Giorigo ; PONTES, A. M. L. ; SOUZA, D.

F. ; SANT'ANNA, L. O. ; OLIVEIRA, M. V. ; SANTOS, L. S. ; MATTOS-GUARALDI, A. L. Physichemistry and Ionic Strength on Abiotic surfaces of Medical devices Influence in adherence and biofilm formation by Multi-Drug Resistant *Corynebacterium striatum*. Open Access Journal of Surgery, v. 12, p. 001-005, 2021.

SOUZA, CASSIUS DE ; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; FARIA, YURI VIEIRA ; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA** ; OLIVEIRA, DRYELLE RODRIGUES DE; SANT'ANNA, LINCOLN DE OLIVEIRA ; NAGAO, PRESCILLA EMY ; SANTOS, CINTIA DA SILVA ; MOREIRA, LÍLIAN OLIVEIRA ; MATTOS-GUARALDI, ANA

LUÍZA . Resistance to Antiseptics and Disinfectants of Planktonic and Biofilm-Associated Forms of *Corynebacterium striatum*. Microbial Drug Resistance, v. 00, p. 00, 2020.

SOUZA, CASSIUS DE ; SIMPSON-LOUREDO, LILIANE ; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; FARIA, YURI VIEIRA ; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA** ; COLODETTE, SABRINA DOS SANTOS ; CANELLAS, MARIA E. FREIRE CASTRO ; CUCINELLI, ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO ; LUNA, MARIA DAS GRAÇAS DE ; SANTOS, CINTIA DA SILVA ; MOREIRA, LÍLIAN DE OLIVEIRA ; MATTOS-GUARALDI, ANA LUÍZA . Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK INTERNATIONAL JOURNAL OF GENERAL AND MOLECULAR MICROBIOLOGY, v. 112, p. 1331-1340-1340, 2019.

**Resumos publicados em anais de congressos**

**CABRAL, F. O.**; OLIVEIRA, R. C. ; SANTANNA, L. O. ; MOTA, HIGOR  
FRANCESCHI ; FARIA, YURI VIEIRA ; CUCINELLI, ANDREZZA DO  
ESPIRITO SANTO ; SANTOS, L. S. ; SANTOS, C. S. ; MATTOS-  
GUARALDI, A. L. ; SOUZA,

CASSIUS DE . Morphological changes of *C. striatum* for adaptation in unfavorable environments. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

OLIVEIRA, R. C. ; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA** ; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; CUCINELLI, ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO ; MARONES- GUSMAO, L. N. ; PONTES, A. M. L. ; SILVA, C. M. F. ; MATTOS-GUARALDI, A. L.

; SOUZA, CASSIUS DE . Monitoring and analysis of virulence factors of corynebacteria medical importance isolated in university hospital to metropolitan region of Rio de Janeiro city. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

SOUZA, CASSIUS DE ; OLIVEIRA, R. C. ; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA** ; CUCINELLI, ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO ; SANTANNA, L. O. ; ALVES, G. B. ; FARIA, YURI VIEIRA ; SANTOS, L. S. ; SILVA, C. M. F. ; MATTOS-GUARALDI, A. L. Qualitative analyses of morphological structures of biofilm produce on abiotic substrates by *Corynebacterium* spp. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

**CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA**; OLIVEIRA, G. G. C. ; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; CUCINELLI, ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO ; CAPPELLI, E. A. ; OLIVELLA, J. G. B. ; SILVA, I. F. ; OLIVEIRA, D. R. ; SANTOS, C. S. ; HIRATA JUNIOR, R. ; SOUZA, CASSIUS DE ; MATTOS-GUARALDI, A. L. . Influência do ferro na produção de biofilme em superfícies abióticas por *Corynebacterium striatum*. In: XXIV Congresso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago. Libro de resúmenes ALAM 2018, 2018.

SILVA, C. M. F. ; FARIA, YURI VIEIRA ; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA** ; MARONES-GUSMAO, L. N. ; OLIVEIRA, G. G. C. ; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; OLIVELLA, J. G. B. ; CUCINELLI, ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO ; COLODETTE, SABRINA DOS SANTOS ; GARCIA, B. S. ; SANTOS, C. S. ; HIRATA JUNIOR, R. ; SOUZA, CASSIUS DE ; MATTOS-GUARALDI, A. L. . Aspectos epidemiológicos e microbiológicos de amostras multi-resistentes de *Corynebacterium* spp. isoladas de pacientes atendidos de unidade hospitalar localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro. In: XXIV

Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago. Libro de Resúmenes ALAM 2018, 2018.

FARIA, YURI VIEIRA; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA**; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; OLIVEIRA, G. G. C. ; SILVA, C. M. F. ; OLIVEIRA, V. W. A.

; CUCINELLI, ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO ; FERNANDES, L. M. O. ; PONTES,

A. M. L. ; OLIVEIRA, D. R. ; SILVA, R. S. ; SANTOS, C. S. ; HIRATA JUNIOR, R. ; MATTOS-GUARALDI, A. L. ; SOUZA, CASSIUS DE . Effects of proteinase-K on biofilm of multidrug resistant *Corynebacterium* strains. In: XXIV Congresso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago. Libro de Resúmenes ALAM 2018, 2018.

SOUZA, CASSIUS DE ; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA** ; OLIVEIRA, G. G. C. ; FREIRES, D. M. T. ; MOTA, HIGOR FRANCESCHI ; FARIA, YURI VIEIRA ; RAMOS, J.

N. ; SOUZA, M. C. ; SANTOS, L. S. ; SANTOS, C. S. ; VIEIRA, V. V. ; HIRATA JUNIOR,

R. ; MOREIRA, LÍLIAN DE OLIVEIRA ; MATTOS-GUARALDI, ANA LUÍZA . Tolerância a biocidas e outros aspectos fenotípicos e moleculares de fatores de virulência de células sésseis e planctônicas de *Corynebacterium striatum*. In: XXIV Congresso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago. Libro de Resúmenes ALAM 2018, 2018.

### Capítulos de livros publicados

SILVA, I. F. ; SANTANNA, L. O. ; SILVA-SANTANA, G. ; **CABRAL, FELLIPE DE OLIVEIRA** ; SANTOS, L. S. ; MATTOS-GUARALDI, A. L. . INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO CAUSADA POR *CORYNEBACTERIUM* SPP.. In: Yasmin da Silva Santos;Fernanda Ferreira

Evangelista. (Org.). Anais do Congresso On-line de Ciências da Saúde. 1ed.: Even3, 2020, v. 1, p. 1-6.