



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Lincoln de Oliveira Sant'Anna**

***Corynebacterium* spp. potencialmente uropatogênicas: caracterização molecular, descrição de novos táxons e investigação do potencial de virulência da espécie rara *Corynebacterium mycetoides***

**Rio de Janeiro**

**2022**

Lincoln de Oliveira Sant'Anna

***Corynebacterium* spp. potencialmente uropatogênicas: caracterização molecular,  
descrição de novos táxons e investigação do potencial de virulência da espécie rara**

***Corynebacterium mycetoides***

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

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

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2022

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

S232 Sant'Anna, Lincoln de Oliveira.  
*Corynebacterium* spp. potencialmente uropatogênicas: caracterização molecular, descrição de novos táxons e investigação do potencial de virulência da espécie rara *Corynebacterium mycetoides* / Lincoln de Oliveira Sant'Anna – 2022.  
253 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Viana Vieira

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

1. Trato urinário – Infecções - Teses. 2. *Corynebacterium* - Teses. 3. Infecções por *Corynebacterium*. 4. Sistema urinário - microbiologia. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Vieira, Verônica Viana. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.871.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Lincoln de Oliveira Sant'Anna

***Corynebacterium* spp. potencialmente uropatôgenicas: caracterização molecular,  
descrição de novos táxons e investigação do potencial de virulência da espécie rara  
*Corynebacterium mycetoides***

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

Aprovado em 31 de janeiro de 2022.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Viana Vieira  
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi (Orientadora)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

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

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

## **DEDICATÓRIA**

Para minha família, com todo o meu amor. Minha esposa, filhas e irmã, pessoas que estiveram comigo me suportando durante todos os momentos de alegrias e aflições. Com vocês eu fui muito mais forte e sem dúvida alguma, sem vocês ao meu lado eu não teria conseguido chegar até aqui. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me oferecer cotidianamente a oportunidade bendita de ser melhor como pessoa e por sempre me conduzir nos caminhos da vida.

À Nossa Mãe, Maria Santíssima, por nunca me abandonar como filho e sempre estar à minha frente. Para a Senhora, o meu eterno *Totus Tuus*.

Aos meus pais, Maria Célia (*in memoriam*) e Gil Afonso (*in memoriam*), por serem minha base de vida, meu porto seguro, minha fonte de inspiração e por me conduzir por todos os caminhos, sempre me dando suporte para ser quem eu sou hoje. Amo vocês eternamente.

À minha irmã, Karla (para mim Karlotinha), por ser a irmã mais maravilhosa do mundo, por me ajudar sempre e em todos os momentos, por tudo! Literalmente, se não fosse por você eu não existiria.

À minha esposa, Louisy, por ser tudo para mim, por ter confiado, por ter sido paciente durante todos esses anos, por ter me escolhido para ser seu e principalmente por ter querido ser minha. Valeu a pena ter caminhado por tantos anos para te encontrar. Nosso amor vai além dessa vida e para sempre eu quero te amar.

Às minhas filhas, Sophia e Clara, por serem o meu motivo de vida e de felicidade. Obrigado por mostrar ao papai o que é ter um coração fora do peito. Papai ama vocês.

Aos meus familiares, por todo o apoio recebido durante minha caminhada estudantil.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Ana Luíza de Mattos Guaraldi, por ter confiado e por me apoiar com suas palavras de incentivo durante todos esses anos de estudo.

À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup>. Verônica Viana Vieira, por ter caminhado ao meu lado nessa missão e por ter me levantado quando eu não acreditava mais que seria possível. Serei grato pelo seu “sim” para sempre.

Ao Prof. Raphael Hirata Júnior (*in memoriam*), meu eterno professor, aquele com quem eu tive o primeiro contato na UERJ, que me apoiou a voltar e conquistar meu estágio e, certamente, aquele que nunca irá deixar de nos assistir em nossos experimentos. Obrigado por todos os conselhos.

Aos meus amigos, Juliana Nunes e Paulo Baio, que fizeram o impossível para me ajudar durante os últimos anos, compartilhando seus conhecimentos, bens mais preciosos.

Aos meus amigos e irmãos de coração, por suas verdades, carinho, apoio, conforto e risadas.

Aos demais colegas do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, nossa família LDCIC, em especial à Liliane Simpson e Elisabete Cappelli, por todo o companheirismo durante todos esses anos.

Aos professores de toda a minha vida, por terem sido o ponto de início e sem dúvidas os primeiros responsáveis por toda essa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia – PPG-MICRO/FCM/UERJ, por permitir que esse sonho se tornasse realidade.

À toda equipe técnica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ, por todo o apoio e partilha de conhecimento durante esses anos.

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

Tudo aquilo que sou ou pretendo ser devo a um anjo: minha mãe.

*Abraham Lincoln*

## RESUMO

SANT'ANNA, Lincoln de Oliveira. ***Corynebacterium* spp. potencialmente uropatogênicas:** caracterização molecular, descrição de novos táxons e investigação do potencial de virulência da espécie rara *Corynebacterium mycetoides*. 2022. 253 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A infecção do trato urinário (ITU) causadas por bactérias é considerada a segunda infecção mais comum em humanos. Diversos fatores podem aumentar a susceptibilidade à ITU, incluindo idade, sexo e comorbidades, como a doença renal. Embora bactérias Gram-negativas estejam entre os principais uropatógenos, algumas espécies de bactérias Gram-positivas têm sido, com crescente frequência, relacionadas às ITU, como as do gênero *Corynebacterium*. Além de quadros de ITU, as corinebactérias também têm sido cada vez mais associadas a casos de infecções invasivas, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos. Ressalta-se nas últimas décadas o aparecimento de isolados multidroga-resistentes destas espécies em todo o mundo. No entanto, microorganismos deste gênero permanecem frequentemente identificados erroneamente e/ou descartados como contaminantes quando isolados de materiais clínicos, em parte, devido à crescente descrição de novas espécies como consequência do avanço dos estudos moleculares e da bioinformática. Além disso, métodos de identificação limitados, baseados em culturas e testes bioquímicos, ainda utilizados em laboratórios de microbiologia, contribuem para este problema. No presente estudo, seis isolados de *Corynebacterium* spp. oriundos de urina humana de indivíduos com problemas renais foram caracterizados através de testes fenotípicos e análises moleculares. Adicionalmente, foram realizados estudos filogenéticos e taxonômicos destes isolados. Duas novas espécies de *Corynebacterium* foram descritas e é relatado, pela primeira vez, o potencial patogênico para o trato urinário humano da espécie rara, *Corynebacterium mycetoides*. Dentre os isolados, cinco foram identificados erroneamente com base nas metodologias convencionais e moleculares, como o sistema MALDI-TOF MS e o sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*. As análises filogenéticas e de taxonomia genômica indicaram a formação de dois grupos distintos que compreendem espécies novas de *Corynebacterium*, cujos nomes propostos foram *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. e *Corynebacterium hiratae* sp. nov.. O isolado raro, *C. mycetoides*, revelou-se multirresistente e com potencial patogênico para o trato urinário, sendo capaz de aderir às superfícies diversas de compostos amplamente utilizados na confecção de materiais hospitalares e ambulatoriais de uso urológico, além de ser capaz de interagir e sobreviver no interior de células epiteliais renais *in vitro*. A necessidade de dados precisos e atualizados sobre as espécies de *Corynebacterium* é evidente, particularmente à luz das preocupações em relação à resistência antimicrobiana e à patogenicidade destes microrganismos. Assim, estudos envolvendo corinebactérias, sobretudo as isoladas de infecções em humanos, devem ser encorajados, não somente para que o conhecimento acerca da diversidade microbiana desse gênero seja divulgado, mas também para auxiliar na elaboração de protocolos baseados em evidências para a prevenção e tratamento das diversas infecções causadas por esses microorganismos, seja no ambiente hospitalar ou na comunidade.

Palavras-chave: Infecções do trato urinário. *Corynebacterium mycetoides*. Taxonomia genômica. *Corynebacterium* spp.

## ABSTRACT

SANT'ANNA, Lincoln de Oliveira. ***Corynebacterium* spp. potentially uropathogenic:** molecular characterization, description of new taxa and investigation of the virulence potential of the rare species *Corynebacterium mycetoides*. 2022. 253 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Urinary tract infection (UTI) caused by bacteria is considered the second most common infection in humans. Several factors can increase susceptibility to UTI, including age, sex, and comorbidities such as kidney disease. Although Gram-negative bacteria are among the main uropathogens, some species of Gram-positive bacteria have been increasingly related to UTIs, such as those of the *Corynebacterium* genus. In addition to UTI conditions, corynebacteria have also been increasingly associated with cases of invasive infections, especially in immunocompromised individuals. In recent decades, it's important to note the appearance of multidrug-resistant isolates of these species in the whole world. However, microorganisms of this genus are often misidentified and/or discarded as contaminants when isolated from clinical materials, in part, due to the increasing description of new species because of advances in molecular studies and bioinformatics. Furthermore, limited identification methods based on cultures and biochemical tests still used in microbiology laboratories and contribute to this problem. In the present study, six isolates of *Corynebacterium* spp. from human urine of individuals with kidney problems were characterized through phenotypic tests and molecular analyses. Additionally, phylogenetic, and taxonomic studies of these isolates were carried out. Two new species of *Corynebacterium* were described and the pathogenic potential for the human urinary tract of the rare species, *Corynebacterium mycetoides*, were also reported for the first time. Among the isolates, five were erroneously identified based on conventional and molecular methodologies, such as the MALDI-TOF MS system and the 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing. Phylogenetic and genomic taxonomy analyzes indicated the formation of two distinct groups comprising new species of *Corynebacterium*, whose proposed names were *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. and *Corynebacterium hiratae* sp. nov.. The rare isolate, *C. mycetoides*, was characterized as multidrug-resistant and with pathogenic potential for the urinary tract, being able to adhere to different surfaces of compounds widely used in the manufacture of hospital and outpatient supplies for urological use, in addition to being able to interact and survive within renal epithelial cells *in vitro*. The need for accurate and up-to-date data on *Corynebacterium* species is evident, particularly considering concerns about antimicrobial resistance and the pathogenicity of these microorganisms. Therefore, studies involving corynebacteria, especially those isolated from infections in humans, should be encouraged, not only so that knowledge about the microbial diversity of this genus is disseminated, but also to assist in the development of evidence-based protocols for the prevention and treatment of several infections caused by these microorganisms, either in the hospital environment or in the community.

Keywords: Urinary tract infection. *Corynebacterium mycetoides*. Genomic taxonomy. *Corynebacterium* spp.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|              |                                                                                       |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| AAI          | <i>Average amino acid identity</i>                                                    |
| ANF-1        | <i>Absolute Nonfermenter 1</i>                                                        |
| ANI          | <i>Average nucleotide identity</i>                                                    |
| ATCC         | <i>American Type Culture Collection</i>                                               |
| BGPI         | Bastonetes Gram-positivos Irregulares                                                 |
| BrCAST       | Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos                       |
| CAMP         | <i>Christie–Atkins–Munch–Peterson</i>                                                 |
| CDC          | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>                                     |
| CI           | Cistite Intersticial                                                                  |
| dDDH         | Hibridização digital de DNA-DNA                                                       |
| DDH          | <i>DNA-DNA Hybridization</i>                                                          |
| DNA          | Ácido desoxirribonucleico                                                             |
| DNase        | Desoxirribonuclease                                                                   |
| DSM          | <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>                                          |
| <i>dtxR</i>  | <i>Diphtheria Toxin Repressor</i>                                                     |
| EAS          | Elementos Anormais e Sedimetoscopia                                                   |
| EndoE        | Endoglicosidade                                                                       |
| Fg           | Fibrinogênio                                                                          |
| G+C          | guanina + citosina                                                                    |
| ITU          | Infecção do Trato Urinário                                                            |
| kDa          | <i>Kilodalton</i>                                                                     |
| LC           | Linfadenite caseosa                                                                   |
| MALDI-TOF MS | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry</i> |
| MDR          | Multidroga-resistente                                                                 |
| MLSA         | <i>Multilocus Sequence Analysis</i>                                                   |
| n            | Número de amostras                                                                    |
| NanH         | Neuraminidase                                                                         |
| NCTC         | <i>National Collection of Type Cultures</i>                                           |
| NDC          | <i>Non-diphtheria Corynebacterium</i>                                                 |

|        |                                                                                           |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| nom.   | Nome                                                                                      |
| nov.   | Nova                                                                                      |
| NTTB   | <i>Non-Toxigenic Tox gene-Bearing</i>                                                     |
| OMS    | Organização Mundial da Saúde                                                              |
| pb     | Pares de bases                                                                            |
| PCR    | <i>Polimerase Chain Reaction</i>                                                          |
| pH     | Potencial hidrogeniônico                                                                  |
| PLD    | Fosfolipase D                                                                             |
| Rbp    | <i>Ribosome-Binding Protein</i>                                                           |
| rev.   | Revivido                                                                                  |
| RNA    | Ácido ribonucleico                                                                        |
| sp.    | Espécie                                                                                   |
| Spa    | <i>Sortase-mediated pilus assembly</i>                                                    |
| spp.   | Espécies                                                                                  |
| STEC   | <i>Shiga toxin-producing Escherichia coli</i>                                             |
| Stx    | <i>Shiga Toxin</i>                                                                        |
| synon. | Sinônimo                                                                                  |
| TD     | Toxina Diftérica                                                                          |
| UFC    | Unidades Formadoras de Colônia                                                            |
| XSMA   | <i>Corynebacterium xerosis, Corynebacterium minutissimum, C. striatum e C. amycolatum</i> |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                               |                            |
|-------------------------------|----------------------------|
| %                             | Porcentagem                |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de Hidrogênio     |
| β                             | beta                       |
| δ                             | sigma                      |
| n°                            | número                     |
| >                             | maior                      |
| °C                            | graus Celsius              |
| ®                             | registrado                 |
| ™                             | <i>Trade Mark</i>          |
| <                             | menor                      |
| ΔT <sub>m</sub>               | <i>melting temperature</i> |
| T                             | cepa tipo                  |
| ≥                             | maior ou igual a           |

## SUMÁRIO

|         |                                                                                                                                                                                                          |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|         | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                                                                                                  | 14 |
| 1       | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                                                                                                                                                       | 16 |
| 1.1     | <b>Infecções do trato urinário</b> .....                                                                                                                                                                 | 16 |
| 1.1.1   | <u>Microbiota do trato urinário</u> .....                                                                                                                                                                | 17 |
| 1.1.2   | <u>Fisiopatologia e etiologia das ITU</u> .....                                                                                                                                                          | 18 |
| 1.1.3   | <u>Principais patógenos causadores de ITU</u> .....                                                                                                                                                      | 20 |
| 1.1.4   | <u>Diagnóstico</u> .....                                                                                                                                                                                 | 21 |
| 1.1.4.1 | Diagnóstico clínico .....                                                                                                                                                                                | 21 |
| 1.1.4.2 | Diagnóstico laboratorial .....                                                                                                                                                                           | 22 |
| 1.1.5   | <u>Tratamento e prevenção</u> .....                                                                                                                                                                      | 23 |
| 1.2     | <b>Gênero <i>Corynebacterium</i></b> .....                                                                                                                                                               | 23 |
| 1.2.1   | <u><i>Corynebacterium</i> spp. potencialmente produtores de toxina diftérica – <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, <i>Corynebacterium ulcerans</i> e <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i></u> ..... | 25 |
| 1.2.2   | <u><i>Corynebacterium</i> spp. não produtores de toxina diftérica associados a ITU</u> .....                                                                                                             | 27 |
| 1.2.3   | <u><i>Corynebacterium mycetoides</i></u> .....                                                                                                                                                           | 33 |
| 1.3     | <b>Fatores de virulência de corinebactérias</b> .....                                                                                                                                                    | 34 |
| 1.4     | <b>Susceptibilidade de <i>Corynebacterium</i> spp. aos agentes antimicrobianos</b> .....                                                                                                                 | 40 |
| 1.5     | <b>Isolamento e identificação de <i>Corynebacterium</i> spp.</b> .....                                                                                                                                   | 41 |
| 1.5.1   | <u>Identificação fenotípica</u> .....                                                                                                                                                                    | 42 |
| 1.5.2   | <u>Identificação molecular</u> .....                                                                                                                                                                     | 44 |
| 1.6     | <b>Taxonomia bacteriana</b> .....                                                                                                                                                                        | 45 |
| 1.6.1   | <u>Taxonomia genômica</u> .....                                                                                                                                                                          | 48 |
| 2       | <b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....                                                                                                                                                                   | 52 |
| 2.1     | <b>Objetivo geral</b> .....                                                                                                                                                                              | 53 |
| 2.2     | <b>Objetivos específicos</b> .....                                                                                                                                                                       | 53 |
| 3       | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                                                                                                                  | 54 |
| 3.1     | <b>Artigo 1: <i>Corynebacterium guaraldiae</i> sp. nov., uma nova espécie de <i>Corynebacterium</i> de infecções humanas</b> .....                                                                       | 55 |
| 3.2     | <b>Artigo 2: <i>Corynebacterium hiratae</i> sp. nov. isolada de urina humana e</b>                                                                                                                       |    |

|     |                                                                                                                                                                                                                          |     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|     | proposta do nome revivido de <i>Corynebacterium nigricans</i> Shukla <i>et al.</i> , 2003 pro synonym. <i>Corynebacterium aurimucosum</i> para <i>Corynebacterium nigricans</i> (ex. Shukla et al., 2003) nom. rev. .... | 85  |
| 3.3 | Artigo 3: Potencial de virulência da primeira amostra de <i>Corynebacterium mycetoides</i> de urina humana: uma espécie rara de <i>Corynebacterium</i> . ....                                                            | 147 |
| 4   | <b>DISCUSSÃO</b> .....                                                                                                                                                                                                   | 212 |
|     | <b>CONCLUSÕES</b> .....                                                                                                                                                                                                  | 222 |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                                                                                                                                 | 224 |
|     | <b>APÊNDICE A</b> – Registro de submissão do Artigo 1 .....                                                                                                                                                              | 243 |
|     | <b>APÊNDICE B</b> – Registro de submissão do Artigo 3 .....                                                                                                                                                              | 246 |
|     | <b>APÊNDICE C</b> – Demais artigos científicos publicados durante o período de doutoramento .....                                                                                                                        | 248 |
|     | <b>APÊNDICE D</b> – Apresentação oral no 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia .....                                                                                                                                 | 252 |
|     | <b>APÊNDICE E</b> – Prêmio de melhor trabalho da Área de Coleções de Cultura e Taxonomia do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia ....                                                                               | 253 |

## INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) são doenças comuns que acometem homens e mulheres de todas as faixas etárias e apresentam variabilidade quanto às formas de apresentação e intensidade. A ITU é considerada o processo infeccioso bacteriano mais frequente na população geral, tanto em nível comunitário quanto em nível hospitalar, representando uma das maiores causas de consultas médicas em todo o mundo (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019; GUPTA et al., 2011; SIMÕES E SILVA; OLIVEIRA; MAK, 2020).

Os introitos vaginal e uretral abrigam uma microbiota que pode apresentar algumas espécies dos gêneros estreptococos, estafilococos e lactobacilos, além de microorganismos corineformes. Entretanto, os bacilos Gram-negativos entéricos são os agentes etiológicos mais frequentemente observados em ITU, sendo *Escherichia coli* a espécie que apresenta maior uropatogenicidade, sendo responsável por 75% a 80% dos casos, com seus fatores de virulência detalhadamente investigados na literatura, contribuindo significativamente com uma alta taxa de morbidade. Outros bacilos Gram-negativos entéricos como *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* são considerados agentes causadores de ITU (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019; KONINGSTEIN et al., 2014).

O número de casos de infecções humanas relacionadas com algumas espécies do gênero *Corynebacterium* tem sido crescente tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, podendo levar a óbito pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. O aparecimento de amostras multidroga-resistentes (MDR) e o aumento do número de casos de infecções de origens diversas, algumas fatais, têm contribuído para aumentar o interesse por esse grupo de Bastonetes Gram-positivos Irregulares (BGPI). As apresentações clínicas das infecções dependem da espécie envolvida, tendo como principais sítios de infecção o trato urinário e respiratório inferior, sítios intravenosos (cateter e sangue), líquido peritoneal, feridas cirúrgicas, além de lesões cutâneas, abscessos e secreção ocular. Entretanto, o potencial patogênico dos microorganismos corineformes permanece subestimado pelos profissionais de saúde e na maioria dos laboratórios esses patógenos permanecem sendo descartados como meros contaminantes (BERNARD.; FUNKE, 2015; KALT et al., 2018; KATES; STARR; BOURASSA, 2020; MARTINS et al., 2009; SANCHEZ ELUCHANS et al., 2021; SHARIFF; ADITI; BERI, 2018).

Atualmente, entre os membros do gênero *Corynebacterium*, *Corynebacterium urealyticum* permanece descrito como o principal agente causador de ITU. Contudo, tem sido observado um aumento no isolamento de outras espécies deste gênero em urinoculturas, sobretudo naquelas provenientes de pacientes imunocomprometidos, de indivíduos com longo tempo de internação, de transplantados ou com neoplasias (BARBERIS, et al., 2021; CAMELLO, et al., 2009; DIAS, et al., 2010; ESKANDAR et al., 2020; LÓPEZ et al., 2009; SOKOL-LESZCZYNSKA et al., 2019).

Ao contrário do observado para *E. coli*, escassas são as pesquisas relacionadas às ITU causadas por diferentes espécies de corinebactérias, inclusive no ambiente hospitalar, principalmente em países em desenvolvimento. A identificação de *Corynebacterium* spp. é um dos grandes desafios que os laboratórios clínicos enfrentam devido principalmente a enorme diversidade de espécies. Os métodos de identificação comerciais disponíveis não são suficientes para identificar com clareza o enorme número de microorganismos que o gênero contempla, dificultando ainda mais a valorização microbiológica e clínica dos isolados (ADDERSON et al., 2008).

Nas últimas décadas, a identificação de microorganismos corineformes nos laboratórios clínicos tem sido mais frequente, ampliando consideravelmente o conhecimento de espécies que não as reconhecidamente patogênicas, quanto a participação nos processos infecciosos em humanos, principalmente com a utilização da metodologia *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS, em português, Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo) na rotina de diagnóstico microbiológico. Ademais, nos laboratórios especializados e de pesquisa, com o avanço da tecnologia na área molecular com os métodos de sequenciamento de alto rendimento, tornou-se crescente a descoberta de novas espécies e a frequente descrição e/ou reclassificação taxonômica de *Corynebacterium* spp. (PICHON, et al., 2019; RYCHERT, 2019).

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Infecções do trato urinário

Infecções do trato urinário (ITU) são doenças frequentes que podem ocorrer em qualquer parte do sistema urinário através da invasão de um microorganismo, sendo a porta de entrada mais comum a uretra. Nos Estados Unidos da América, as ITU são responsáveis, em média, por 8 milhões consultas médicas anuais, mais de 300.000 hospitalizações e estima-se que 7.500.000 mulheres sejam infectadas por ano (CORTES-PENFIELD; TRAUTNER; JUMP, 2017; PAZ-ZARZA et al., 2019). No Reino Unido, as ITU chegaram a representar 23% das infecções e estiveram associadas a aproximadamente 8% das bacteremias por uso de cateter (BECKFORD-BALL, 2006). Pesquisas sugeriram que 50% das mulheres e 12% dos homens vivenciarão ao menos um episódio de infecção urinária durante sua vida e que aproximadamente 25% das mulheres apresentarão infecções recorrentes entre 6 e 12 meses (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019).

As infecções urinárias resultam de uma série de interações complexas entre os uropatógenos e o hospedeiro, com manifestações agudas ou crônicas, ou permanecendo assintomáticas (ASADI KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2019). As ITU são classificadas em inferior, quando acometem a uretra (uretrite), bexiga (cistite) e próstata (prostatite), e superior, quando comprometem a pelve renal (pielonefrite), os rins (nefrite intersticial) e causam abscessos renais (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019).

As ITU também são classificadas em complicadas e não complicadas. A ITU é classificada como não complicada quando ocorre em paciente com estrutura e função do trato urinário normal e é adquirida fora de ambiente hospitalar. As condições que se associam à ITU complicada incluem as de causa obstrutiva (hipertrofia benigna de próstata, tumores, urolitíase, estenose de junção uretero-piéllica, corpos estranhos, etc.); anátomofuncionais (bexiga neurogênica, refluxo vesico-ureteral, rim-espongiomedular, nefrocalcinose, cistos renais, divertículos vesicais); metabólicas (insuficiência renal, diabetes mellitus, transplante renal); uso de cateter de demora ou qualquer tipo de instrumentação (ASADI KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2019).

As ITU podem ocorrer em todas as idades, acometendo preferencialmente um dos sexos em cada faixa etária, com exceção da terceira idade. Durante o primeiro ano de vida, o

sexo masculino é geralmente o mais atingido em virtude da maior incidência de malformação uretral nessa população. Já durante a infância, as ITU acometem com maior frequência o sexo feminino devido ao menor comprimento da uretra neste grupo e ao refluxo de urina. Na fase adulta, o panorama se mantém com o predomínio do sexo feminino em razão do início das atividades sexuais. Em adultos do sexo masculino, as ITU são raras e comumente associadas às infecções prostáticas subjacentes. Nos idosos, episódios de ITU são extremamente comuns, independentemente do sexo, seja de forma sintomática ou assintomática, principalmente devido à mucosa vaginal atrófica nas mulheres e à hiperplasia prostática nos homens. Independente da faixa etária, a gestação, o diabetes mellitus, a imunossupressão e outras doenças de base são fatores que favorecem o aparecimento destas infecções (ANVISA, 2013; CORTES-PENFIELD; TRAUTNER; JUMP, 2017; GONZÁLEZ-CHAMORRO et al., 2012; SIMÕES E SILVA; OLIVEIRA; MAK, 2020).

#### 1.1.1 Microbiota do trato urinário

As espécies bacterianas pertencentes à microbiota residente da pele, uretra e trato genital dos seres humanos podem, eventualmente, causar ITU. Logo, o conhecimento da microbiota é necessário para prevenção e tratamento das ITU (STAPLETON, 2016). Os gêneros bacterianos mais comumente encontrados no trato urinário são *Lactobacillus* e *Streptococcus*, ambos são associados ao ácido láctico e desempenham um papel importante contra patógenos. Outros gêneros que são encontrados no trato urinário são: *Alloscardovia*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Jonquetella*, *Klebsiella*, *Saccharofermentans*, *Rhodanobacter* e *Veillonella* (ARAGÓN et al., 2018).

Em estudos de culturas advindas de amostras vaginais de mulheres saudáveis, foi identificado que as espécies do gênero *Lactobacillus* compreendem 90% dos microorganismos presentes e que cerca de 80 a 90% destes produzem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A produção de  $H_2O_2$ , diminuição do pH pela produção de ácido láctico e a produção de componentes antimicrobianos, dificulta a infecção desta região por microorganismos uropatogênicos. Fatores como a redução da secreção de estrógeno, utilização de contraceptivos e uso de antimicrobianos, alteram a constituição da microbiota vaginal, principalmente, pela perda da carga de *Lactobacillus* spp., resultando na quebra da barreira química (STAPLETON, 2016).

Em contraste ao que se imaginava a respeito da esterilidade da urina, estudos com base no microbioma urinário revelaram que ainda que em casos de culturas negativas, o trato urinário de indivíduos saudáveis podem ser portadores de uma microbiota de diversos vírus e bactérias, microbiologicamente distinto do observado em pacientes com bacteriúria assintomática (CORTES-PENFIELD; TRAUTNER; JUMP, 2017). Posteriormente a análise da composição da microbiota do trato urinário em pacientes com ITU demonstrou que na cistite intersticial (CI) as espécies de *Lactobacillus* foram predominantes, compreendendo 90% das amostras destes pacientes em comparação ao controle (60%). Deste modo, foi sugerido que essa mudança para um urótipo de *Lactobacillus* poderia impactar na gravidade dos sintomas, o que é bem intrigante devido a muitas espécies combaterem uropatógenos, porém o papel desses microorganismos na CI não foi bem compreendido (MAGISTRO; STIEF, 2019).

Considerando a possibilidade de contaminação de amostras de urina com microorganismos da microbiota, principalmente da vagina, o isolamento destas espécies neste material, sobretudo quando em culturas polimicrobianas, é com frequência desconsiderado. Este fato pode representar um erro devido ao crescente número de casos da literatura que mostram que bactérias pertencentes à microbiota residente podem em alguns casos ocasionar a ITU (KLINE; LEWIS, 2016). Além de bactérias, os fungos também são capazes de causar ITU, inclusive *Candida albicans*, frequentemente associado as ITU em indivíduos hospitalizados (ODABASI; MERT, 2020).

### 1.1.2 Fisiopatologia e etiologia das ITU

O trato urinário dispõe de diversos mecanismos de defesa que dificultam o estabelecimento dos microorganismos e, assim, o progresso da infecção, incluindo o efeito mecânico da micção, a concentração osmótica da urina, o baixo pH, a ação bactericida dos fluidos prostáticos, a camada de muco que recobre a mucosa vesical, a presença de citocinas, células fagocitárias e anticorpos (ANVISA, 2013; FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019; PALLETT; HAND, 2010).

Para iniciar e manter o processo infeccioso é preciso que o patógeno ultrapasse as primeiras barreiras do hospedeiro ganhando acesso a bexiga e conseguindo se fixar e colonizar no epitélio urinário. Três vias de acesso ao trato urinário são bem conhecidas: a via

ascendente (ou transuretral), pela qual o microorganismo invade a bexiga através da uretra; a via hematogênica, pela qual ocorre a disseminação do microorganismo oriundo da corrente sanguínea; e via extensão direta, em que o microorganismo tem acesso à bexiga por uma fístula formada a partir do intestino. Dentre as três vias de infecção, a mais comum é a via ascendente. Neste contexto, a uretra feminina por ser menor (5 cm) é menos eficaz em deter a infecção quando comparada com a uretra masculina (20 cm). Outro fator que contribui para a incidência aumentada das ITU por esta via é o ato sexual, que facilita o movimento ascendente do microorganismo até a uretra, sobretudo em mulheres, além dos hábitos de higiene através da autoinoculação de patógenos entéricos no trato urinário (FARRELL; DEMPSEY, 2014; KLEIN; HULTGREN, 2020).

As internações hospitalares e a realização de procedimentos que invadem o trato urinário também contribuem para o aparecimento das ITU. Um dos procedimentos mais frequentes que envolvem a manipulação do trato urinário é o cateterismo vesical. Tal procedimento favorece a penetração do microorganismo no trato urinário por três formas distintas: no momento da inserção do cateter; através da luz do cateter; e por meio da interface mucosa-cateter. Neste procedimento, diversos mecanismos de defesa são comprometidos, sendo um deles a interrupção do funcionamento das glândulas presentes na uretra que secretam produtos com ação bactericida (ANVISA, 2013; PROCOP, 2017).

Os fatores que predisõem a colonização dessas espécies entéricas ainda não foram bem compreendidos, mas é sabido que as alterações na microbiota vaginal, a utilização de antibióticos, contraceptivos e as diversas infecções genitais desempenham um papel importante (PROCOP, 2017). Além disso, os próprios microorganismos possuem diversos mecanismos que lhes permitem aderir às células do trato urinário e também produzir uma série de substâncias que provocam agressão ao epitélio e alteram sua fisiologia, permitindo a ocorrência da infecção. *E. coli*, por exemplo, é capaz de ascender o trato urinário e se fixar através de fatores de aderência como fimbria tipo I e fimbria P e adesinas não fimbriais que permitem a adesão e a resistência à eliminação pelo fluxo urinário (JORGENSEN; SEED, 2012; LALA; MINTER, 2021; SIMÕES E SILVA; OLIVEIRA; MAK, 2020).

Outro mecanismo que contribui para o avanço da infecção e que está envolvido com as ITU recorrentes é a formação de biofilme por uropatógenos (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019; MAHESWARI et al., 2013). Os biofilmes vêm sendo estudados nos últimos 30 anos e têm ganhado importância nos meios científico e clínico em virtude do seu papel em muitas doenças infecciosas, como endocardite, osteomielite, periodontite, sinusite e

otite média, além das ITU (APARNA; YADAV, 2008; DONLAN; COSTERTON, 2002; GOMES et al., 2009).

Os biofilmes são compreendidos como comunidades de microorganismos aderidos às superfícies bióticas ou abióticas, revestidos por uma matriz extracelular produzida pelos seus próprios componentes. Estas estruturas complexas se desenvolvem dinamicamente através de processos que envolvem aderência, crescimento, mobilidade e produção de polissacarídeo extracelular. Os microorganismos presentes no biofilme apresentam, em geral, características fenotípicas diferentes dos planctônicos, sendo altamente resistentes aos agentes antimicrobianos e desinfetantes (APARNA; YADAV, 2008).

Os biofilmes, ao serem formados em estruturas bióticas, como na superfície interna da bexiga, funcionam como verdadeiros reservatórios de microorganismos e contribuem para a recorrência das infecções, uma vez que dificultam o acesso dos agentes antimicrobianos e anticorpos. Além disso, as superfícies de dispositivos médicos de longa permanência tornam-se uma excelente plataforma para a formação destas estruturas e, assim, para o desenvolvimento das infecções (CHRISTENSEN et al., 1985; MARRIE; COSTERTON, 1984).

### 1.1.3 Principais patógenos causadores de ITU

As ITU podem ser causadas por diversos microorganismos, frequentemente resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, o que representa um grande problema para o sistema de saúde, pois prolonga o tempo de internação e, conseqüentemente, os gastos relacionados a saúde (DA SILVA TRENTIN; BRANDT GIORDANI; MACEDO, 2013; SIMÕES E SILVA; OLIVEIRA; MAK, 2020).

Dentre os microorganismos que são responsáveis pelos quadros de ITU, *E. coli* é a espécie mais comumente encontrada, com a média de 75% dos casos de ITU não complicadas e 65% dos casos de ITU complicadas. Contudo, espécies de *Enterococcus* e *Candida* também são frequentes em pacientes que utilizam dispositivos no trato urinário. Outras espécies da família Enterobacteriaceae, bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* hemolíticos do grupo B, e não fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Stenotrophomonas* spp., também são reportadas, porém em menor

frequência (ASADI KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2019; FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019).

#### 1.1.4 Diagnóstico

##### 1.1.4.1 Diagnóstico clínico

As ITU podem se manifestar por diversos sinais e sintomas, os quais podem ser sistêmicos ou locais, e variáveis de acordo com a idade do indivíduo. Em neonatos e crianças até dois anos, elas podem ser totalmente assintomáticas ou desencadear sintomas inespecíficos como: irritabilidade, diminuição na amamentação, menor desenvolvimento pondero-estatural, diarreia e vômitos, dentre outros. Nas idades superiores a esta, os relatos de sintomas como disúria, frequência e dor abdominal, podem ser descritos (ANVISA, 2013).

Nos adultos, os sintomas mais relacionados a ITU baixa são: disúria frequente, urgência miccional e, ocasionalmente dor em região pélvica, hematúria e/ou piúria. Já nas ITU superior, os sintomas incluem febre, calafrios, dor em flancos ou lombar, náuseas e vômitos, cefaleia, indisposição e disúria (AMMENTI et al., 2020; PALLETT; HAND, 2010).

Em idosos, as ITU são de difícil diagnóstico principalmente quando ocorre desorientação ou doença demencial, por não haver a possibilidade de identificar os sinais específicos e, na maioria das vezes, por existir a associação com outros processos infecciosos. Neste grupo, sinais e sintomas como delírio, incontinência ou retenção urinária, acidose metabólica e/ou alcalose respiratória, podem indicar presença de infecções desta natureza (LALA; MINTER, 2021; PALLETT; HAND, 2010).

Em pacientes cateterizados é comum observar febre, bacteriúria e outras manifestações clínicas associadas, o que dificulta o diagnóstico de ITU. É importante considerar que somente a febre não é suficiente para concluir o diagnóstico destas infecções. Portanto, outros sinais e sintomas, quando presentes, devem ser considerados, como a sensibilidade costovertebral e dores localizadas que podem irradiar ou não (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019). Nos casos mais complicados, o choque séptico pode ocorrer devido à sepse urinária. Esses casos são majoritariamente observados em pacientes com longos períodos de hospitalização e/ou que se submeteram à instrumentação do trato

urinário, como por exemplo, com uso prolongado do cateter vesical de demora ou procedimentos cirúrgicos (FARRELL; DEMPSEY, 2014; PROCOP, 2017).

#### 1.1.4.2 Diagnóstico laboratorial

Embora o diagnóstico de ITU seja baseado primeiramente nos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo, diversos exames laboratoriais corroboram o diagnóstico e contribuem para a escolha do tratamento. Em geral, o exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS) é suficiente para determinar a conduta médica. Contudo, a cultura da urina e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos permitem que o microorganismo seja identificado e traçado a conduta terapêutica (ANVISA, 2013).

Nos indivíduos saudáveis, a urina é estéril, embora a região periuretral seja colonizada por microorganismos comensais, incluindo os de origem fecal. Isto pode favorecer a contaminação da urina durante a coleta do material biológico para análise laboratorial na investigação da ITU. Neste caso, a infecção é diferenciada da contaminação através de métodos quantitativos de cultura (FARRELL; DEMPSEY, 2014; FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019).

Segundo a Anvisa (2013), através do Manual de Microbiologia Médica, a ITU é confirmada quando há o isolamento do microorganismo em cultura pura, com o crescimento bacteriano igual ou maior que  $10^5$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro (ml) de urina colhida em jato médio e de maneira asséptica. Em determinados casos, algumas exceções são observadas: em idosos, pacientes com infecções crônicas e em uso de antibióticos, é considerado o crescimento maior ou igual a  $10^4$  UFC/ml; em culturas realizadas através da coleta por punção suprapúbica, o crescimento maior ou igual a  $10^2$  UFC/ml é suficiente, tanto em mulheres quanto em homens de qualquer faixa etária (NICOLLE, 2005); em homens com sinais e sintomas de ITU, é considerado o crescimento maior ou igual a  $10^3$  UFC/ml. Embora estas observações sejam suficientes para o diagnóstico, outros dados laboratoriais e clínicos devem ser avaliados juntamente com os resultados da cultura da urina para que seja possível o encerramento do diagnóstico (BAYRAK et al., 2007; GUPTA; GRIGORYAN; TRAUTNER, 2017).

### 1.1.5 Tratamento e prevenção

As principais questões a serem consideradas nos tratamentos das ITU são: tipo de infecção; condições clínicas do paciente; eficácia e efeitos colaterais dos antimicrobianos; a duração do tratamento; e a presença de critérios que justifiquem a hospitalização, quando aplicável. Observa-se que é comum a administração nos quadros agudos e não complicados o uso da nitrofurantoína, trimetropim-sulfametoxazol e fosfomicina. Esses medicamentos são escolhidos principalmente por possuírem poucos efeitos colaterais. Para os demais casos de ITU são comuns a administração de fluoroquinolonas e beta-lactâmicos. Outros antibióticos também devem ser considerados em casos isolados de resistência ou impossibilidade de tratamento, como por exemplo, as cefalosporinas de terceira geração e aminoglicosídeos (CHU; LOWDER, 2018; c, 2017; MCLELLAN; HUNSTAD, 2016).

A escolha do antimicrobiano para o tratamento de ITU deve ser individualizada, avaliando a eficácia, os riscos de efeitos adversos e tendo como base o conhecimento dos perfis de resistência dos microorganismos aos agentes antimicrobianos disponíveis. Outros fatores também devem ser levados em consideração, tais como: o custo e a disponibilidade do medicamento, e fatores específicos do paciente, como a idade, o histórico de alergia medicamentosa, a existência de doenças de base e gravidez (COLGAN; WILLIAMS, 2011; FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019; LALA; MINTER, 2021; SIMÕES E SILVA; OLIVEIRA; MAK, 2020).

O aumento do entendimento do papel do microbioma na saúde, a seleção de cepas resistentes devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento de infecções diversas e com isso a dificuldade para a terapêutica da ITU devido a patógenos cada vez mais resistentes direcionaram os olhares para a prevenção da ITU para medidas não antimicrobianas, como por exemplo o uso de probióticos, flavonoides (cranberry) e as vacinas (GUPTA; GRIGORYAN; TRAUTNER, 2017).

## 1.2 **Gênero *Corynebacterium***

A classe *Actinobacteria*, pertencente ao filo *Actinobacteria*, é um dos maiores grupos no domínio das bactérias. Esta classe foi subdividida em 19 ordens, 52 famílias, 367 gêneros e

2.894 espécies bacterianas com base na sequência do gene 16S rRNA e nas suas relações supragênicas (PARTE et al., 2020). O gênero *Corynebacterium*, descrito em 1896 por Lehmann e Neumann, cuja espécie tipo é o *Corynebacterium diphtheriae*, pertence a esta classe, e que por sua vez pertence a ordem *Corynebacteriales* e a família *Corynebacteriaceae*, compreendem uma coleção de microorganismos caracterizados por bacilos Gram-positivos irregulares, aeróbios ou anaeróbios facultativos, imóveis, não formadores de esporos, não álcool-ácido resistente, catalase positiva, cujo DNA possui alto conteúdo de guanina e citosina (G+C) (CRESCI et al., 2016; GHERARDI et al., 2015). Outra característica deste gênero e de outros membros da ordem *Corynebacteriales* é a presença da micomembrana, composta por ácido micólico que recobre a parede celular bacteriana da maioria das espécies de *Corynebacterium* assemelhando-se funcionalmente com a membrana externa das bactérias Gram-negativas (BURKOVSKI, 2014).

Até o presente momento, o gênero *Corynebacterium* contempla cerca de 133 espécies (PARTE et al., 2020), disseminadas amplamente em diversos nichos biológicos, tais como, amostras clínicas humanas, solo, água, alimento, indústria e materiais sintéticos (JAÉN-LUCHORO et al., 2020), algumas delas de interesse das áreas médica, veterinária e biotecnológica (OLIVEIRA et al., 2017). Diversas espécies são reconhecidas como patógenos humanos e animais e muitas outras são pertencentes a microbiota de pele e mucosas humanas, sendo capazes de causar infecções ou serem transmitidas para os humanos através do contato com animais (BERNARD, 2012).

Conhecidamente, o gênero *Corynebacterium* possui patógenos clássicos como *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Entretanto, há muitos anos, que se discute sobre o potencial patogênico das demais espécies *Corynebacterium* (PADMANABHAN et al., 2014), que por muitas vezes são consideradas como irrelevantes ou contaminantes quando recuperadas de amostras clínicas (FUNKE et al., 1997). Desde a década de 90, tanto os microbiologistas clínicos quanto os médicos se tornaram mais conscientes do potencial patogênico e da grande diversidade de corinebactérias associadas a doenças humanas (FUNKE et al., 1997).

Os recentes avanços tecnológicos em relação a detecção e identificação de microorganismos têm facilitado a compreensão da importância clínica de espécies bacterianas que antes se pensava serem contaminantes da microbiota comensal (MCMULLEN et al., 2017b). Uma ampla variedade de *Corynebacterium* spp. tem sido reportada nos últimos anos, principalmente em países industrializados e em desenvolvimento, relacionadas a quadros infecciosos, por vezes fatais, em diversos sítios anatômicos, bem como o aumento de

fenótipos MDR aos agentes antimicrobianos, principalmente em *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium amycolatum* e *Corynebacterium jeikeium*. Também têm sido reportado que *Corynebacterium* spp. estão cada vez mais associadas com quadros infecciosos em indivíduos imunocompetentes, imunocomprometidos e imunossuprimidos (BAIO et al., 2013; MCMULLEN et al., 2017b; SENGUPTA et al., 2015; WAGNER et al., 2012).

#### 1.2.1 *Corynebacterium* spp. potencialmente produtores de toxina diftérica – *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*

*C. diphtheriae* é o patógeno humano mais bem caracterizado do gênero *Corynebacterium*. É o principal agente etiológico da difteria clássica, uma doença infecciosa aguda imunoprevenível que afeta principalmente o trato respiratório e é potencialmente fatal devido à ação da toxina diftérica (TD), uma potente exotoxina, a qual apresenta tropismo para o miocárdio, sistema nervoso central, rins e suprarenais (GALAZKA; ROBERTSON, 1996).

Apesar da existência de um programa de vacinação contra difteria desde a década de 40, esta doença que foi uma das mais prevalentes e temidas antes da Era da vacinação, ainda hoje representa um grave problema de Saúde Pública em todo o mundo. Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), permanecem ocorrendo surtos em diversos países em desenvolvimento e industrializados, além da difteria permanecer endêmica em diversas partes do mundo, particularmente em países em desenvolvimento, como Índia, Vietnã, Caribe e países da América do Sul (BRASIL, 2019).

No Brasil, a difteria permanece de forma controlada, com o número de casos diminuindo progressivamente desde a década de 90, segundo a última nota técnica lançada em 2019 informando a respeito da situação epidemiológica. Contudo, dois países, nos últimos anos, preocupam o governo brasileiro com relação a difteria. Haiti e Venezuela iniciaram um surto epidêmico nos anos 2014 e 2016, respectivamente, e em virtude do fluxo migratório para os estados federados brasileiros nos últimos anos as autoridades brasileiras alertam para o risco de casos da doença no país. O último óbito por difteria no Brasil foi de uma criança de 10 anos, o caso foi considerado importado da Venezuela e ocorreu no estado de Roraima. Em 2019, apenas dois casos de difteria foram notificados para as autoridades de vigilância (BRASIL, 2019).

Cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD também são capazes de causar infecções importantes. Estas infecções variam de lesões cutâneas e faringites a endocardites (DE SANTIS et al., 2020; FERNANDEZ-PITTOL et al., 2019; FUCHS et al., 2020), bacteremia (SHANMUGAM et al., 2021), osteomielite (PEIXOTO et al., 2016) e infecção relacionada ao uso de cateter (GOMES et al., 2009). É preciso ressaltar que estes quadros já foram descritos tanto em pacientes imunizados como em pacientes não imunizados.

Outras espécies do gênero *Corynebacterium* também são capazes de produzir a TD e têm sido alvo de estudos em diversos países: *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*. *C. ulcerans* está filogeneticamente relacionado ao *C. diphtheriae*, foi descrita por Gilbert e Stewart (1926), oriunda de orofaringe de um caso semelhante a difteria. Classicamente tem sido descrita como agente etiológico de quadros diversos de infecções em animais, principalmente de mastites em gado bovino. Os primeiros casos de infecções em humanos foram normalmente associados ao consumo de leite não fervido/pasteurizado e derivados. A partir de meados da década de 1980, o número de casos de difteria de natureza zoonótica causada pelo *C. ulcerans* aumentou em diferentes países. Na Inglaterra, por exemplo, o número de casos de difteria por esta espécie superou o relacionado com o agente etiológico clássico, *C. diphtheriae* (BONMARIN et al., 2009; SHARMA et al., 2019; TIWARI et al., 2008).

*C. pseudotuberculosis*, descrito por Buchanan em 1911 (BERNARD; FUNKE, 2015), é agente causador de diversas doenças de cunho veterinário, dentre as quais a linfadenite caseosa (LC) e a linfangite ulcerativa, tendo por isso grande interesse veterinário e econômico (KURIA; HOLSTAD, 1989). Em humanos, *C. pseudotuberculosis* pode causar infecção cujos sinais e sintomas são semelhantes ao da LC, e o modo de transmissão mais aceito é por contato com animais doentes ou ingestão de carne ou leite contaminados (TROST et al., 2010a). Com base na expressão da enzima nitrato redutase, que permite a conversão de nitrato a nitrito em provas bioquímicas, esta espécie pode ser dividida em dois biovars, denominados *ovis* e *equi*. O biovar *equi* (sorotipo II) é capaz de reduzir o nitrato, enquanto o biovar *ovis* (sorotipo I) não apresenta esta habilidade (BATEY, 1986; COSTA, 2002). Cepas isoladas de ovinos e caprinos pertencem geralmente ao biovar *ovis*, enquanto as de cavalos e búfalo pertencem ao biovar *equi* e as de gado são variáveis (DORELLA et al., 2006; TEJEDOR-JUNCO et al., 2008).

### 1.2.2 Corynebacterium spp. não produtores de toxina diftérica associados a ITU

Além da preocupação com as cepas produtoras de TD, a comunidade científica e os profissionais de saúde têm voltado sua atenção para outros processos infecciosos causados principalmente por amostras não produtoras de TD. Espécies clinicamente relevantes de *Corynebacterium* ocasionalmente são reportadas como causadoras de infecções em humanos e recomenda-se que a identificação destas em caso de isolamento a partir de amostras clínicas seja realizada caso: (1) sejam oriundas de sítios estéreis; (2) material clínico tenha sido devidamente coletado e a espécie de *Corynebacterium* seja a espécie predominante; e (3) tenham sido isoladas em culturas puras de urina com contagem  $> 10^4$  UFC/mL ou de forma predominante (crescimento  $> 10^5$  UFC/mL) em culturas polimicrobianas (BERNARD; FUNKE, 2015).

*C. urealyticum*, anteriormente denominado como *Corynebacterium* grupo D2, descrito por Pitcher e colaboradores (1992), faz parte da microbiota humana, podendo ser encontrado em 12% da população saudável e em 30% dos pacientes hospitalizados, principalmente naqueles que estejam em uso de antibióticos de amplo espectro. Esta espécie tem sido estudada por décadas e reconhecida como agente causador de quadros de bacteriúria assintomática e raramente cistite e pielite encrustada alcalina (GUIMARAES et al., 2013; KLINE; LEWIS, 2016). *C. urealyticum* tem como característica o crescimento lento e apresentar uma forte atividade ureásica, fator esse que está relacionada diretamente com sua virulência desempenhando um papel importante na patogênese da infecção urinária por induzir a deposição de fosfato de amônio magnésiano (Pedras de Estruvita) na parede vesical. A formação dessas pedras são sinais clínicos característicos por infecções causadas por *C. urealyticum*. Relatos apontam que essa espécie possui ampla taxa de multirresistência aos antimicrobianos, como: ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, cefalotina, rifampicina, tetraciclina, ofloxacina, imipenem e gentamicina (KLINE; LEWIS, 2016; MAUREY et al., 2019; SORIANO; TAUCH, 2008).

Routineiramente, as infecções por *C. urealyticum* são facilmente descartadas por requererem meios de culturas artificiais enriquecidos e pelo seu fator de crescimento ser lento e muitas vezes não positivarem dentro do tempo preestabelecido pelos laboratórios clínicos. As colônias de *C. urealyticum* só começam a apresentar crescimento a partir de 48 horas em placa de ágar sangue de carneiro 5%. Por outro lado, ainda que na cultura apresente algum crescimento, comumente este é menosprezado por serem considerados como contaminantes

da microbiota após a realização da coloração de Gram. Como fatores de risco para infecções por *C. urealyticum*, observa-se os pacientes imunocomprometidos que tiveram como história pregressa doenças urológicas, hospitalização por tempo prolongado, tratamento com antibióticos de amplo espectro e pacientes com história de transplante renal (KLINE; LEWIS, 2016).

Além da forte atividade ureásica e da multirresistência aos antimicrobianos, outros fatores de virulência relatados incluem a capacidade de aderir e formar biofilme em diferentes superfícies, tanto bióticas quanto abióticas. *C. urealyticum* também se mostra capaz de causar infecções semelhantes as causadas em humanos em animais de companhia, como cães e gatos (MAUREY et al., 2019; SORIANO et al., 2009).

*Corynebacterium coyleae*, descrito por Funke e colaboradores (1997), foi isolado primeiramente de amostras de sangue de pacientes com febre de origem desconhecida. Cabe ressaltar que a época do isolamento primário, um dos pacientes era portador do Vírus da Imunodeficiência Humana e os demais haviam sido submetidos a procedimentos cirúrgicos prévios. Outros relatos de isolamento desta espécie também mostram a capacidade de causar infecções em outros sítios anatômicos, incluindo partes moles e sítios nobres (FERNÁNDEZ-NATAL et al., 2008; TAGUCHI et al., 2006).

Ainda pouco estudada, *C. coyleae* não possui uma definição para seu papel patogênico. O envolvimento de *C. coyleae* em ITU era desconhecido até que Barberis e colaboradores (2018), reportou pela primeira vez um caso de ITU por esta espécie levando o paciente a ser submetido a nefrectomia total de ambos os rins. Após esse caso, *C. coyleae* passou a ser considerado um importante patógeno emergente e a identificação a nível de espécie de materiais clínicos passou a ser recomendado, principalmente quando envolvendo pacientes hospitalizados e imunossuprimidos.

O perfil de susceptibilidades aos antimicrobianos de *C. coyleae* também ainda não é bem conhecido. Sabe-se das espécies até o momento isoladas que em sua maioria são suscetíveis a beta-lactâmicos, gentamicina, vancomicina, tetraciclina, linezolida e rifampicina, apresentando resistência somente à clindamicina. Contudo, as espécies isoladas de ambientes hospitalares mostraram uma taxa de resistência maior do que as espécies isoladas de pacientes ambulatoriais. Estudos mais profundos devem ser realizados para o conhecimento acerca da virulência dessa espécie em quadros de ITU (BARBERIS et al., 2018; FERNÁNDEZ-NATAL et al., 2008).

*Corynebacterium aurimucosum* foi descrito pela primeira vez por Yassin e colaboradores (2002), oriundo de hemocultura de um quadro de bronquite. Relatos da

literatura mostra o envolvimento de *C. aurimucosum* com quadros de bacteremia, aborto espontâneo, infecções pós-cirúrgicas do trato urinário, casos recorrentes de ITU prostatites, infecções em pé diabético, afecções da pele e de diversos quadros clínicos (BERNARD, 2012; ESKANDAR et al., 2020; LO et al., 2015; TROST et al., 2010b). O esclarecimento envolvendo o processo patogênico de *C. aurimucosum* com quadros de ITU é recente e embora tenham poucos estudos que relatem o isolamento dessa espécie em ITU, alguns deles demonstram que a idade, a recorrências das infecções e o uso de antibióticos macrolídeos podem ser um fator de risco para os achados de *C. aurimucosum* em urina (LEAL; JONES; GILLIGAN, 2016).

Dentre os mecanismos de virulência descritos para *C. aurimucosum*, a presença de um pigmento de coloração negra parece estar diretamente associada ao seu estabelecimento na região geniturinária, principalmente em mulheres. Um estudo apontou que o pigmento negro tem ação antioxidante, que em suma, seria capaz de neutralizar a ação oxidante da microbiota vaginal, conseguindo assim se estabelecer como contaminante nessa região e ascender ao colo uterino e infectando a cavidade amniótica e o feto. Outros fatores de virulência como a presença de pilinas presentes nessa espécie podem favorecer a adesão de *C. aurimucosum* na interação microorganismo-hospedeiro e resultar na formação e desenvolvimento de biofilmes (TROST et al., 2010b).

A susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados de *C. aurimucosum* tem sido reportada de maneira variada. Estudos apontam cepas apresentando sensibilidade a glicopeptídeos, linezolida, daptomicina, mas com uma variável resistência aos demais (FERNANDEZ-ROBLAS et al., 2009). Em outro estudo, a resistência à penicilina é reportada, embora cepas MDR não sejam comuns (LEAL; JONES; GILLIGAN, 2016). Um terceiro estudo aponta sensibilidade a eritromicina, lincomicina, vancomicina, cefalotina, imipenem, tetraciclina, ciprofloxacina e cloranfenicol, e resistência à penicilina e ao sulfametoaxol com trimetoprima (LO et al., 2015).

*Corynebacterium riegelii*, descrito pela primeira vez por Funke e colaboradores (FUNKE; LAWSON; COLLINS, 1998) de quadros de infecções urinária em mulheres entre 21 e 62 anos de idade aparentemente sem ligação epidemiológica. Dados da literatura mostram que desde a sua descrição, a associação com quadros de ITU são comuns, incluindo infecções raras e casos fatais (ACOSTA et al., 2017; AYGUN et al., 2013; PICHON et al., 2019). A principal característica, assim como *C. urealyticum* é a forte atividade ureásica. Testes em laboratórios identificaram uma rápida ação dessa atividade com positividade do caldo uréia de Christensen em apenas 5 minutos (FUNKE; LAWSON; COLLINS, 1998). O

perfil de susceptibilidade das quatro cepas descritas por Funke e colaboradores (1998) apresentaram sensibilidade à cefalotina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido fusídico, gentamicina, penicilina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina, e resistência apenas para cefetamet, ceftibuteno e fosfomicina. Atualmente já é possível observar mudanças nos padrões de resistências das cepas de *C. riegelii*, sendo possível observar cepas resistentes principalmente à ciprofloxacina, penicilina, eritromicina e clindamicina (MATSUNAMI et al., 2012; PICHON et al., 2019).

*C. jeikeium*, anteriormente conhecida como CDC do grupo JK, foi descrito por Jackman e colaboradores (1987), é um microorganismo comumente encontrado colonizando períneo, reto e áreas intertriginosas e é encontrado principalmente em pacientes hospitalizados (KISHORE et al., 2015). *C. jeikeium* é uma das espécies de *Corynebacterium* mais conhecidas no ambiente nosocomial capaz de causar diferentes infecções. Tem sido comumente relatado em endocardites incluindo casos fatais (DOWLING; KOEN, 2020), contudo também mostrou-se capaz de causar diversos processos infecciosos, como: ITU (LÓPEZ-GONZÁLEZ GILA et al., 2019), infecções de partes moles (OLENDER; ŁETOWSKA, 2010), bacteremias, infecções pulmonares (SATO; UCHIYAMA, 2012), sobretudo em pacientes submetidos a procedimentos invasivos, tais como cateterismo profundo e implantação de dispositivos cardiovasculares (CHAO; HUANG; YEN, 2013; CLARKE; ABDUR RAHMAN; SAUL, 2019). É preciso ressaltar que *C. jeikeium* é uma das espécies mais resistentes do gênero *Corynebacterium* aos agentes antimicrobianos, sendo susceptíveis apenas aos glicopeptídeos. Por este motivo, a vancomicina é muitas vezes o antimicrobiano utilizado em infecções por *C. jeikeium* (BECHARA et al., 2011; BLÄCKBERG et al., 2021).

*Corynebacterium glucuronolyticum* foi primeiramente descrito por Funke e colaboradores em 1995 (BERNARD; FUNKE, 2015), em um paciente com infecção do trato geniturinário. É geralmente encontrado no trato urogenital de humanos, principalmente homens e de suínos (CURRY et al., 2015; DEVRIESE et al., 2000). *C. glucuronolyticum* é considerado como um agente raro causador de prostatite e uretrite não gonocócica (GALAN-SANCHEZ et al., 2011). Também existem relatos de uretrites, prostatites e infecções em outras regiões do trato urinário baixo (NOVO-VELEIRO et al., 2013). Um caso raro de cistite encrustada causada por *C. glucuronolyticum* já foi reportado em um paciente de 57 anos sem comorbidades ou históricos de cirurgias ou procedimentos urológicos, fatores esses que são predisponentes para esse tipo de infecção (CURRY et al., 2015). Dados da literatura até o momento indicam que *C. glucuronolyticum* é considerado um patógeno em potencial com

habilidades comparadas a outros patógenos urogenitais bem estabelecidos atualmente (MEŠTROVIĆ et al., 2019).

Descrita primeiramente pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, em português, Centro de Controle e Prevenção de Doenças) como *Corynebacterium* do grupo *absolute nonfermenter* 1 (ANF-1, em português, não fermentador) em 1981 e posteriormente renomeada como *Corynebacterium afermentans* por Riegel e colaboradores (1993), esta espécie tem sido isolada de hemoculturas (ÖLMEZ et al., 2021), abscessos cerebral, pulmonar e hepático (DYKHUIZEN et al., 1995; MINKIN; SHAPIRO, 2004), urinoculturas (CAMELLO et al., 2003) e sepse (KUMARI et al., 1997). Grupos brasileiros e internacionais observaram em estudos distintos cepas MDR de *C. afermentans* (BERNIER; BERNARD, 2016; CAMELLO et al., 2003).

Uma das causas importantes para o subdiagnóstico de infecções causadas por *Corynebacterium* spp. emergentes é a dificuldade de se chegar à identificação a nível de espécie. Para que haja um tratamento direcionado o diagnóstico correto de uma infecção é imprescindível. Algumas *Corynebacterium* spp. são muito próximas fenotipicamente fazendo com que o diagnóstico microbiológico seja inconclusivo. Essas espécies são consideradas “difíceis de identificar” (SANTOS et al., 2017). A diferenciação entre as espécies exige o emprego de técnicas moleculares e testes fenotípicos adicionais não utilizados rotineiramente nos laboratórios clínicos (ZASADA; MOSIEJ, 2018). As espécies *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium minutissimum*, *C. striatum* e *C. amycolatum* possuem características fenotípicas pouco distintas entre si e formam um complexo conhecido como XSMA. A presença frequente em infecções clínicas importantes, principalmente em ambientes nosocomiais e o aparecimento de cepas MDR comumente observadas nessas espécies fazem com que esse complexo quando isolado de uma amostra clínica seja caracterizado a nível de espécie para que o direcionamento terapêutico seja realizado da melhor forma (PACHECO et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

*C. xerosis*, descrito primeiramente por Lehmann e Neumann (1896), foi isolado de secreção de ouvido de uma criança. Seus relatos de infecção em humanos são poucos e a maioria dos isolados foram subsequentemente reconhecidos como *C. amycolatum* devido à sua proximidade fenotípica (FUNKE et al., 1996; WAUTERS et al., 1998). Contudo, esta espécie já foi relacionada à infecção de sítio cirúrgico (RIZVI et al., 2013), endocardite (BELMARES et al., 2007), sepse (KIMURA et al., 2017), abscessos (BORDE et al., 2020) e recentemente em uma infecção pós-parto de uma mulher com derivação ventrículo-peritônioal (HOCAOĞLU et al., 2019).

*C. striatum* é um microorganismo potencialmente patogênico para humanos, frequentemente associado a surtos nosocomiais (BAIO et al., 2013). Nas últimas décadas, essa espécie tem sido uma das mais frequentemente recuperadas de diversas superfícies e equipamentos médicos, principalmente em ambientes hospitalares (SHU et al., 2019). Infecções por *C. striatum* foram descritas tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em indivíduos imunocompetentes (NUDEL et al., 2018; SUPERTI et al., 2009). Dentre estas infecções, destacam-se: ITU (LÓPEZ et al., 2009), infecções pulmonares (SHARIFF; ADITI; BERI, 2018), meningite (KAMMOUN et al., 2016), endocardite (FERNÁNDEZ GUERRERO et al., 2012; LEE; LEE; KIM, 2018), infecções sanguíneas (RAMOS et al., 2018) e artrite séptica (ROY; AHMAD, 2016). Não somente os casos infecciosos estão ganhando evidência clínica, como também cepas MDR estão emergindo ao longo dos anos (ALIBI et al., 2017; HAHN et al., 2016; WANG, JUNRUI et al., 2016). Estudos já realizados levantam suspeitas de transmissão pessoa para pessoa de infecções por *C. striatum*, tanto através dos profissionais de saúde como pelo próprio ambiente hospitalar (BAIO et al., 2013; CRUM-CIANFLONE; BALLON-LANDA; ZORN, 2014; WANG et al., 2021).

*C. minutissimum*, assim como outras corinebactérias, também pertence à microbiota residente da pele e mucosas humanas. Desde a sua descrição, por Sarkany e colaboradores, em 1962 (COLLINS; JONES, 1983), como agente etiológico do eritrasma, relatos associando *C. minutissimum* com casos de ITU, infecções do trato respiratório e infecções relacionada a cateter (MARTINS et al., 2009), endocardite (APERIS; MOYSSAKIS, 2007), bacteremia e meningite (DALAL; LIKHI, 2008), pielonefrite (AHMAD; AHMAD, 2005) e infecção abdominal (SHIN et al., 2014) têm sido reportados, emergindo como um potente causador de infecções de sítio cirúrgico e invasivas importantes envolvendo tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes (PACHECO et al., 2015). A presença ambiental de *C. minutissimum* também já foi documentada em um estudo chinês, que identificou como a espécie dominante em proporções significativas em amostras de bioaerossóis de um mercado de aves (GAO et al., 2016).

*C. amycolatum* é uma das espécies do gênero *Corynebacterium* mais isoladas de espécimes clínicos (TORIBIO; MARRODÁN; FERNÁNDEZ-NATAL, 2017). Foi descrita por Collins e colaboradores (1988), isolado de pele humana e sua principal característica é a ausência de ácido micólico, que por sua vez é presente na maioria das corinebactérias (FUNKE et al., 1997). É também frequentemente resistente aos antimicrobianos, característica que contribui para a sua distinção entre as outras espécies no diagnóstico microbiológico (ESTEBAN et al., 1999; OTEO et al., 2001; SENGUPTA et al., 2015). *C.*

*amycolatum* já foi isolado de pacientes com quadros de bacteremia (YOON et al., 2011), ITU (MARTINS et al., 2009), infecções relacionadas a cateter (CARVALHO et al., 2018), mastite granulomatosa (BORDE et al., 2020), infecções orbitais (TORIBIO; MARRODÁN; FERNÁNDEZ-NATAL, 2017), secreções auriculares (SENGUPTA et al., 2015), infecções ortopédicas (KALT et al., 2018), sepse (DE MIGUEL; RODRÍGUEZ; MARTÍN, 1999) e endocardite (DA ROCHA et al., 2018). Acredita-se que o número de casos infecciosos reportados seja maior, uma vez que *C. amycolatum* é frequentemente identificado como *C. xerosis* (TORIBIO; MARRODÁN; FERNÁNDEZ-NATAL, 2017).

### 1.2.3 *Corynebacterium mycetoides*

*Corynebacterium mycetoides*, originalmente descrito em 1942 por Aldo Castellani, um patologista e bacteriologista italiano, passou por diversas reclassificações até ser devidamente enquadrado ao gênero *Corynebacterium*. *C. mycetoides*, foi isolado originalmente de úlcera tropicalóide, uma ferida que comumente ocorre nos membros inferiores e que afetava os soldados das regiões desérticas da África do Norte (CAPOCACCIA; ORTALI, 1956; COLLINS, 1982).

Inicialmente, Castellani, em 1942, classificou o microorganismo isolado das úlceras tropicalóides como *Micrococcus mycetoides*. Em 1943, Negro, considerando a semelhança morfológica com os microorganismos do gênero *Streptococcus*, reclassificou o microorganismo como *Streptococcus mycetoides*. Anos depois, em 1949, Castellani sugeriu outra reclassificação taxonômica, passando a considerar o microorganismo como *Coccobacillus mycetoides*, contudo, considerou essa reclassificação temporária. Posteriormente, com base nos estudos realizados por Capocaccia e Ortali, em 1956, observou-se que de fato as reclassificações anteriores estavam equivocadas, propondo então uma nova reclassificação, que agregava o microorganismo no gênero *Corynebacterium*, passando a ser chamado de *Corynebacterium mycetoides*. Contudo, somente em 1982, quando Collins pesquisou as propriedades bioquímicas e demonstrou que *C. mycetoides* era de fato uma espécie distinta das demais espécies de *Corynebacterium* descritas até aquela época, que o nome foi devidamente incluído na lista de nomes bacterianos aprovados, revalidando assim a sua descrição taxonômica (CAPOCACCIA; ORTALI, 1956; COLLINS, 1982).

*C. mycetoides* quando cultivado a 37°C por 48/72 horas, em ágar sangue de carneiro ou ágar nutriente, normalmente medem cerca de 1 mm, apresentando colônias amarelas, circulares, convexas e brilhantes. As células são Gram-positivas, mas em alguns momentos podem se apresentar Gram-lábeis. Características corineformes, como por exemplo, o pleomorfismo e o formato em clava, são encontradas, bem como também apresentam grânulos metacromáticos em suas extremidades. Não forma esporo, tampouco é móvel. É anaeróbio facultativo. A catalase e a fosfatase alcalina são positivas. É capaz de fermentar a glicose e algumas linhagens fermentam a trealose. É negativo para a fermentação da maltose, manose, arabinose, lactose, galactose, rafinose, ribose, xilose, melibiose, glicogênio e adonitol. Gelatina e esculina não são hidrolisadas. Não reduz nitrato. Não produz urease. Indol, vermelho de metila são negativos (COLLINS, 1982).

### 1.3 Fatores de virulência de corinebactérias

Os principais estudos que investigam fatores de virulência de corinebactérias foram descritos para *C. diphtheriae*. Não somente nesta espécie, mas em duas outras estreitamente relacionadas (*C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*), o mais conhecido mecanismo de virulência é a TD, um polipeptídeo de aproximadamente 58 kDa com 535 resíduos de aminoácidos. O efeito citotóxico da TD deve-se à inibição da síntese proteica através da ribosilação do fator de alongamento 2 (HOLMES, 2000). É preciso ressaltar que a TD pode ser produzida apenas por amostras que possuem o gene codificador (gene *tox*), carregado por fagos lisogênicos (corinefagos) do tipo  $\beta$  ou  $\beta$ -relacionados (MEINEL et al., 2014), integrado ao seu cromossomo. A integração do corinefagos no genoma bacteriano é capaz de converter cepas não toxigênicas em cepas toxigênicas. Tal transformação já foi descrita em humanos, mas acredita-se que também seja capaz de ocorrer raramente de forma livre na natureza (ZAKIKHANY; NEAL; EFSTRATIOU, 2014). Estudo recentes mostraram que o gene *tox* também pode estar localizado em ilhas de patogenicidade (MEINEL et al., 2014).

O gene *tox* tem sua transcrição negativamente regulada por íons ferro e por uma proteína repressora, conhecida como *Diphtheria Toxin Repressor* (*dtxR*, em português, repressor da toxina diftérica), presente em todas as amostras de *C. diphtheriae* (DE ZOYSA et al., 2005). Recentemente linhagens de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* que carregam o gene *tox*, mas não expressam a TD foram reportados. Essas linhagens são conhecidas como *non-*

*toxigenic tox gene-bearing* (NTTB, em português, não toxigênica portador do gene *tox*) (BILLARD-POMARES et al., 2017; EISENBERG et al., 2014). Com base em análises moleculares foi possível identificar duas possibilidades para que o bloqueio da expressão do gene *tox* ocorra: (1) a deleção de base única, causando assim uma mutação de fase de leitura e (2) a presença de uma sequência de inserção no gene, ambos os mecanismos localizados na subunidade A do gene. Contudo, essa situação não é permanente, podendo as linhagens NTTB a qualquer momento expressar a TD através de uma reversão espontânea ou por recombinação homóloga dos diferentes corinebacteriófagos (ZAKIKHANY; NEAL; EFSTRATIOU, 2014).

Estudos recentes mostraram que a TD não seria a única toxina produzida por espécies do gênero *Corynebacterium*. Weerasekera e colaboradores (2019) caracterizaram funcionalmente um gene que codifica uma *ribosome-binding protein* (Rbp, em português, proteína de ligação ao ribossomo) putativa identificada na linhagem brasileira de *C. ulcerans* 809, isolada de um caso de pneumonia fatal em uma paciente idosa. Tal proteína, apesar de apresentar uma baixa identidade de aminoácidos quando comparada a porção A da toxina Shiga de *Escherichia coli* tipo 1 e 2, possui todos os resíduos de aminoácidos conservados necessários para sua atividade. Ademais, um modelo estrutural construído *in silico* da proteína mostrou semelhanças importantes com a porção A da *Shiga toxin* (Stx, em português, toxina Shiga) tipo 1 de *E. coli*.

A Stx é uma das mais potentes toxinas biológicas conhecidas até o momento. Produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1, a Stx é um polipeptídeo de cerca de 70 kDa com 638 resíduos de aminoácidos que tem como efeito citotóxico a inibição da síntese de proteína em células eucarióticas pela remoção de um resíduo de adenina do rRNA 28S localizado na subunidade do ribossomo 60S e consequente ribosilação dos fatores de alongamento 1 e 2 (WEERASEKERA et al., 2019). A Stx é uma toxina do tipo AB<sub>5</sub>, cuja porção ativa da toxina se restringe a subunidade A através da sua atividade N-glicosidase e a subunidade B (cinco porções idênticas) é composta por um pentâmero responsável pela mediação da ligação da subunidade A ao receptor celular globotriasilceramida (MEINEL et al., 2014; WEERASEKERA et al., 2019).

Como mencionado anteriormente, alguns isolados de *E. coli* com o passar dos anos tornaram-se capazes de produzir dois tipos de Stx (Stx1 e Stx2) e são denominados como *Shiga Toxin-producing Escherichia coli* (STEC, em português, *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga). A Stx1 é quase idêntica à mesma toxina produzida pela *S. dysenteriae* tipo 1 e a Stx2 tem pouca semelhança com a Stx e Stx1, além de ser antigenicamente distinta

(SCHEUTZ et al., 2012). Estudos prévios relatam que a STEC é responsável por uma complicação no processo infeccioso em humanos denominado síndrome hemolítica urêmica e está mais associada com a Stx2 do que com a Stx1. Diversas variantes também já foram descritas de ambos os tipos de Stx (MELTON-CELSA, 2014).

Acredita-se em relação ao gene *Rbp* putativo encontrado na cepa de *C. ulcerans* 809 tenha sido adquirido pela transferência horizontal de genes, uma vez que a porcentagem do conteúdo G+C encontrada na região onde o gene está localizado é inferior em relação a porcentagem do genoma completo da mesma cepa, além do gene *Rbp* putativo encontrar-se flanqueado por genes que codificam um fago integrase putativa e uma transposase (WEERASEKERA et al., 2019).

A ocorrência de infecções causadas pelo *C. diphtheriae* em indivíduos imunizados e o crescente número de infecções invasivas causadas por amostras atoxinogênicas sugerem que outros fatores além da TD são importantes para o aparecimento e manutenção do processo infeccioso. Neste sentido, estudos desenvolvidos nas últimas décadas têm demonstrado que os isolados, independente da produção de toxina, podem aderir com intensidades variadas a diferentes substratos, incluindo células humanas e dispositivos médicos. Várias proteínas fimbriais e não-fimbriais já foram descritas como possíveis participantes destes processos. Além delas, carboidratos de superfície, hidrofobinas e trans-sialidases também parecem estar envolvidas (ANTUNES et al., 2015; BERTUCCINI; BALDASSARRI; VON HUNOLSTEIN, 2004; GOMES et al., 2009; HIRATA et al., 2004; MATTOS-GUARALDI; DUARTE FORMIGA; PEREIRA, 2000).

A presença de fimbrias na superfície do bacilo diftérico foi relatada pela primeira vez por Yanagawa e Honda (1976), quando foi sugerida a sua participação na aderência a eritrócitos de carneiro (hemaglutinação). Desde então, muitos estudos buscaram a sua caracterização estrutural e funcional. Estes revelaram que *C. diphtheriae* pode apresentar três estruturas fimbriais distintas, identificadas com *Sortase-mediated pilus assembly* (Spa, em português, montagem de pilus mediada por sortase): *pilus* SpaA, *pilus* SpaD e *pilus* SpaH, sendo cada *pilus* formado por três subunidades menores: *pilus* SpaA (SpaABC), *pilus* SpaD (SpaDEF), *pilus* SpaH (SpaGHI). Ainda segundo eles, estas estruturas são polimerizadas e conectadas à superfície celular com a participação de diferentes sortases (BROADWAY et al., 2013; GASPAR; TON-THAT, 2006; MANDLIK et al., 2007; TON-THAT; SCHNEEWIND, 2003). Essas fibras que são longas e finas, e que se projetam da superfície da célula têm dentre suas funções principais, realizar a mediação entre a célula bacteriana e a aderência ao tecido do hospedeiro e a formação de biofilme (MCCONNELL et al., 2018).

Análises moleculares mostraram que os genes codificadores das pilinas e das sortases estão localizados em ilhas de patogenicidade, estando parcial ou completamente ausentes em algumas cepas (TROST et al., 2012). O *pilus* SpaA mostrou-se o mais frequente entre as amostras estudadas e, por causa disto, tem sido o principal alvo de estudos sobre a participação das pilinas na virulência de *C. diphtheriae*. Até o momento, já foi descrito o seu envolvimento na aderência às células epiteliais da faringe e no processo patogênico desencadeado no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, utilizado como modelo experimental *in vivo* para estudos de virulência (BROADWAY et al., 2013; MANDLIK et al., 2007). Zasada e colaboradores (2012) também sugeriram que a expressão destas estruturas é indispensável para a ocorrência de infecções invasivas por amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae*.

Dentre as proteínas de natureza não-fimbrial, destacam-se as proteínas DIP1281 (OTT et al., 2010) e DIP 0733 (SABBADINI et al., 2012). A proteína DIP1281, anotada como invasina, tem sido estudada no processo de interação com células de linhagem epitelial de faringe. Entretanto, os resultados obtidos até o momento sugerem que ela esteja envolvida com a organização geral da superfície do bacilo diftérico (OTT et al., 2010). A proteína DIP0733, inicialmente descrita como proteína de superfície não-fimbrial 67-72p, participa na aderência a hemácias humanas (COLOMBO et al., 2001) e a células da linhagem de carcinoma de laringe humana HEP-2 (HIRATA et al., 2004). Além disso, Sabbadini e colaboradores (2012) demonstraram seu efeito na internalização e indução da apoptose em células HEP-2. Recentemente, Antunes e colaboradores (2015) relataram o papel desta proteína na ligação ao colágeno, fibronectina e fibrinogênio (Fg).

Sabbadini e colaboradores (2010) já haviam relatado que cepas de *C. diphtheriae* são capazes de interagir com o Fg humano e também apresentam a habilidade de converter Fg em fibrina (atividade de coagulase), mesmo quando desprovidas do gene *tox*. Esse estudo defendeu a hipótese de que o bacilo diftérico pode explorar a interação com o Fg humano no processo de colonização, manutenção nas superfícies do hospedeiro e/ou dispersão para outros sítios corpóreos.

A participação de carboidratos de superfície e proteínas lectínicas nas interações de *C. diphtheriae* com células do hospedeiro também já foram investigados. Estudos realizados por Mattos-Guaraldi e colaboradores (2000; 1999) revelaram que a superfície do bacilo diftérico apresenta diferentes moléculas contendo resíduos de ácido siálico, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, galactose e manose com afinidade para lectina. Apesar do papel dos carboidratos de superfície na virulência do bacilo diftérico não ter sido bem caracterizado, os resultados obtidos sugerem que eles promovem alterações na hidrofobicidade e na carga

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

É sabido que a presença de ácido siálico na superfície bacteriana deve-se às atividades realizadas pelas sialidases, também designadas neuraminidases. As sialidases são glicosil hidrolases que catalisam a remoção de resíduos de ácido siálico terminais de glicoconjugados presentes na superfície das células do hospedeiro. Através de suas atividades de trans-sialidase, as sialidases permitem também a aquisição do ácido siálico, permitindo ao microorganismo expô-lo na sua superfície externa. Além disso, elas ainda podem funcionar diretamente como adesinas (BURKOVSKI, 2013; KIM et al., 2010).

Além de aderir a superfícies inertes, os microorganismos podem formar estruturas altamente complexas, tais como os biofilmes, os quais possuem importância clínica em virtude do seu papel em muitas doenças infecciosas, incluindo endocardite, periodontite e otite média, e na contaminação de dispositivos hospitalares, sobretudo devido à sua alta resistência aos agentes antimicrobianos (APARNA; YADAV, 2008; DONLAN; COSTERTON, 2002). A habilidade do bacilo diftérico de formar biofilme foi inicialmente descrita por Gomes e colaboradores (2009) a partir do seu isolamento em sítio de inserção de cateter de nefrostomia. Nesse trabalho, foi verificada a capacidade da cepa de formar biofilme nas superfícies do vidro, poliestireno e em cateter de poliuretano. O estudo do biofilme também tem sido realizado para isolados de *C. striatum* de origem hospitalar, em que estão sendo observadas a capacidade de formação de biofilme em diversas superfícies inertes, de isolados causadores de infecção sanguínea e infecções relacionadas a cateteres incluindo isolados MDR (ALIBI et al., 2021; RAMOS et al., 2019).

Além da capacidade de aderir aos tecidos do hospedeiro, já foi demonstrado que o bacilo diftérico é também capaz de penetrar e sobreviver no compartimento intracelular de células respiratórias humanas HEp-2, indicando que este pode ser um dos fatores que favorecem a manutenção do patógeno nas vias aéreas superiores e inferiores, de modo a permitir a permanência do estado de portador após antibioticoterapia, soroterapia e cura da difteria (HIRATA et al., 2004). Adicionalmente, foi demonstrado que amostras de *C. diphtheriae*, independentemente da produção de toxina, podem ser fagocitadas por macrófagos humanos (linhagem U-937) na ausência de opsoninas e permanecem viáveis no compartimento intracelular. A sobrevivência intracelular dentro de macrófagos humanos pode contribuir, assim, para a disseminação bacteriana por via endovascular, além de conferir proteção contra atividades microbicidas mais eficientes de outras células de defesa e contra a ação bactericida de agentes antimicrobianos (DOS SANTOS et al., 2010).

O aumento na frequência e gravidade das infecções humanas associadas a *C. ulcerans*, tem feito desta espécie o objeto de pesquisa em alguns estudos sobre virulência bacteriana. Além da capacidade de produção de TD, *C. ulcerans* é capaz de produzir uma outra exotoxina, a *Phospholipase D* (PLD, em português, fosfolipase D), cuja atividade esfingomielinásica aumenta a permeabilidade vascular e, assim, promove a disseminação tecidual do microorganismo no hospedeiro. Ademais, esta exotoxina é capaz de reduzir a viabilidade de neutrófilos e macrófagos (BERGIN et al., 2000; BONMARIN et al., 2009).

Análises moleculares recentes permitiram detectar genes de potenciais fatores de virulência, como catalase, desoxirribonuclease (DNase), neuraminidase (NanH), endoglicosidade (EndoE) e proteases, além da adesina fimbrial do tipo SpaD (TROST et al., 2011). Estudo recente permitiu também observar que, assim como *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* é capaz de se ligar à fibronectina, colágeno e fibrinogênio (SIMPSON-LOUREDO et al., 2014).

À semelhança do observado em *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* também é capaz de produzir a TD e a PLD, sendo esta última considerada o principal fator de virulência desta espécie. Além da toxigenicidade, amostras de *C. pseudotuberculosis* apresentam a habilidade de resistir a diferentes agentes estressores, o que lhes permite sobreviver no ambiente por meses antes de infectar o hospedeiro animal, e no interior de células eucarióticas, sobretudo de linhagem fagocítica, nas quais também são capazes de se multiplicar (STEFÁŃSKA et al., 2010). Pesquisas recentes têm relacionado a estes processos alguns reguladores transcricionais, como fatores sigma ( $\delta$ ) alternativos da RNA polimerase, e os lipídios tóxicos de parede celular (MORAES et al., 2012; PACHECO et al., 2012). Dentre os fatores  $\delta$ , o  $\delta^E$  tem sido o mais estudado. Os resultados indicam que este regulador é importante para a resistência da espécie ao estresse oxidativo induzido por óxido nítrico e peróxido, o que é determinante para a sobrevivência no interior de fagócitos (PACHECO et al., 2012). Os lipídeos associados à parede celular de *C. pseudotuberculosis* são semelhantes ao ácido micólico de *Mycobacterium tuberculosis* e foram descritos há muito tempo como importantes fatores para a patogênese da doença (HARD, 1975). Esta camada atua conferindo proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos além de conferir baixa permeabilidade ao envelope celular, o que consiste em uma barreira natural contra antibióticos (PORTEVIN et al., 2004).

#### 1.4 Susceptibilidade de *Corynebacterium* spp. aos agentes antimicrobianos

As infecções por bactérias Gram-positivas representam um problema importante ao redor do mundo (KHARE; NARAYANA, 2017). Em contrapartida a essa situação importante, a resistência antimicrobiana, que ao longo das últimas décadas vem crescendo se tornou uma ameaça ao combate das infecções. Como prospecção a este cenário, estima-se que até o ano de 2050, uma pessoa morra de infecções causadas por microorganismos resistentes a cada três segundos (SABINO et al., 2019). Sem dúvidas uma causa direta dessa questão é o uso indiscriminado dos antimicrobianos para fins terapêuticos, incluindo as terapias prescritas de forma inadequada, e agrícolas. Contudo, ainda que em virtude dessas circunstâncias as empresas tenham expressado interesse na descoberta de novos antimicrobianos, o desenvolvimento efetivo de fármacos eficazes tem sido escasso (KHARE; NARAYANA, 2017; SABINO et al., 2019).

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Corynebacterium* spp. são pouco estudados se comparado as outras espécies de bastonetes Gram-positivos. Atribui-se a isso o fato de por muitos anos *Corynebacterium* spp. terem sido descartados por serem considerados como contaminantes na prática clínica (BERNARD; FUNKE, 2015). Estima-se que, desde a década de 60, a susceptibilidade aos antimicrobianos em *Corynebacterium* spp. tem sido estudada, permanecendo por muitos anos sem um consenso de protocolos e interpretação dos pontos de corte e com isso sendo utilizado diferentes critérios interpretativos independente do isolado clínico (BERNARD; FUNKE, 2015; FESSLER; SCHWARZ, 2017). Somente com o lançamento do método de microdiluição em caldo e os pontos de corte para a concentração inibitória mínima para *Corynebacterium* spp. lançado em 2006 pelo Instituto Norte-Americano de Padrões Clínicos e Laboratoriais foi possível um direcionamento padronizado e confiável para traçar os perfis de susceptibilidade do *Corynebacterium* spp. (BERNARD; FUNKE, 2015). Atualmente, desde a publicação da Portaria nº 64/2018, do Ministério da Saúde, os laboratórios públicos e privados seguem as recomendações do Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST, em português, Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos) para realizar os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para as espécies do gênero *Corynebacterium* (BRASIL, 2018).

Durante a década de 70, cepas de *C. diphtheriae* foram consideradas susceptíveis as classes de antibióticos comumente utilizadas nos tratamentos agudos, como a penicilina e a eritromicina. Anos depois, durante a década de 90, *C. diphtheriae* eram susceptíveis aos

antimicrobianos: beta-lactâmicos, cefalosporinas de terceira geração, pefloxacina, imipenem e vancomicina, embora já existissem relatos de resistência às cefalosporinas de gerações anteriores e à lincomicina e eritromicina. Ainda durante a mesma década, foi confirmada para algumas espécies de *Corynebacterium* a resistência a duas ou mais classes de antibióticos (BERNARD; FUNKE, 2015). Na primeira década do milênio, *C. jeikeium* foi reportado como resistente à daptomicina (SCHOEN et al., 2009), bem como *C. resistens* foi considerado sensível somente à vancomicina e minociclina (OTSUKA et al., 2005).

Dentre os mecanismos de resistência aos antimicrobianos encontrados em *Corynebacterium* spp. até o momento, destacam-se aqueles que envolvem os genes: *ermB*, *ermC* e *ermX*, conferindo resistência simultânea aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B; *mef*, conferindo resistência aos macrolídeos; mutações em *gyrA*, conferindo resistências às quinolonas e fluoroquinolonas; *tetA* e *tetB*, conferindo resistência à tetraciclina, oxacilina e oxitetraciclina; *cmxA* e *cmxB*, relacionado a resistência ao cloranfenicol; *bla* e *ampC*, conferindo resistência aos betalactâmicos e o *aphA1*, conferindo resistências aos aminoglicosídeos (CAMPANILE et al., 2009). É importante ressaltar que alguns dos genes acima já foram encontrados em cromossomos e plasmídeos.

### 1.5 Isolamento e identificação de *Corynebacterium* spp.

A identificação dos microorganismos em laboratórios clínicos vêm sofrendo modificações significativas e o objetivo principal é alcançar uma identificação cada vez mais rápida e confiável. Os métodos de identificações tradicionais mais frequentemente utilizados são baseados nas propriedades bioquímicas das bactérias. Entretanto, um ponto importante que deve ser mencionado em relação a evolução do diagnóstico microbiológico através da utilização de métodos moleculares, como as técnicas *Polimerase Chain Reaction* (PCR, em português, reação em cadeia da polimerase), análises proteômicas, sequenciamento de DNA, que tornaram possíveis a identificação rápida e confiável diretamente dos materiais clínicos, por vezes sem a necessidade da cultura microbiológica (ZASADA; MOSIEJ, 2018).

A maioria das espécies do gênero *Corynebacterium* podem ser cultivadas em ágar sangue de carneiro a 5%, sob temperatura de 30-37°C por períodos que variam de 24-48 horas. Para o isolamento, considerando a alta resistência a fosfomicina, meios seletivos contendo uma concentração de 1g/L deste antibiótico pode ser utilizado. Ademais, para

espécies lipofílicas, a suplementação com 0,1-1,0% de Tween 80 é comumente utilizada. Outra possibilidade de crescimento das espécies lipofílicas é o cultivo prolongado (72h), por exemplo, como realizado para o isolamento de *C. urealyticum* oriundo de amostras de urina (BERNARD; FUNKE, 2015).

Em relação as espécies de importância médica, as potencialmente produtoras da TD, alguns meios de cultura podem ser utilizados para a triagem, como por exemplo, ágar Tinsdale, ágar cistina-telurito, ágar sangue com telurito, e o ágar chocolate com telurito. Contudo, embora sejam comumente utilizados os meios com telurito nos laboratórios clínicos e de pesquisa, eles não seriam uma forma confiável para a distinção dos isolados potencialmente produtores da TD dos demais, visto que já foi demonstrado que em virtude dos níveis de resistência ao telurito de isolados de *C. diphtheriae*, independente da origem, biotipo ou potencial de toxigenicidade, resultados falso-positivos podem ser encontrados (BERNARD, 2012; BERNARD; FUNKE, 2015; DOS SANTOS et al., 2015).

A identificação microbiológica pode ser dividida em três formas: (i) identificação fenotípica, (ii) identificação molecular e (iii) identificação genômica.

#### 1.5.1 Identificação fenotípica

A identificação microbiológica de *Corynebacterium* spp., como na maioria das identificações inicia-se através das observações da morfologia colonial, presença de pigmentação, da coloração de Gram ou em alguns casos da coloração de Albert-Laybourn (identificação presuntiva de *C. diphtheriae*), reações de catalase, positiva para todas *Corynebacterium* spp., e oxidase, e através da lipofilia, que por sua vez é observada através do pouco crescimento em caldo ou do crescimento de colônias minúsculas em meio sólido após o período de 24 horas de incubação (BERNARD, 2012; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

A identificação fenotípica pode ser realizada da forma convencional ou através de kits semiautomatizados ou equipamentos automatizados, como atualmente se realiza nos laboratórios de análises clínicas e de pesquisa. Conforme já mencionado anteriormente, devido ao número de espécies e principalmente aos novos táxons recentemente descritos, a identificação microbiológica de *Corynebacterium* spp. é um desafio para os microbiologistas (FUNKE et al., 1997; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

A identificação fenotípica convencional de *Corynebacterium* spp. é baseada na utilização de provas bioquímicas compreendendo a utilização de açúcares diversos, teste de CAMP, hemólise, hidrólise da ureia, redução de nitrato, produção de pirazinamidase, entre outros, para posterior comparação com os esquemas de identificação, quase não é realizada, com exceção em alguns centros de referências e os ambientes de pesquisa. Essa técnica exige força de trabalho capacitada para preparar os meios de culturas e testes bioquímicos específicos para a identificação desses microorganismos. Outro ponto importante inerente a essa técnica de identificação é o tempo que é demandado para a realização do controle de qualidade dos meios de cultura e testes bioquímicos (BERNARD, 2012; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

Diversos kits de identificação fenotípica estão disponíveis no mercado atualmente, dentre eles, destacam-se o API® Coryne (bioMerieux, France), RapID™ CB Plus (Remel/Thermo-Fisher Scientific, USA) e BBL™ Crystal™ GramPositive ID System (Becton Dickinson, USA). Em geral, esses testes são desenvolvidos de forma semelhante aos testes convencionais, contendo em seus kits, meios desidratados que são reidratados quando o inóculo contendo o microorganismo é adicionado. Após o período de incubação, os testes bioquímicos são lidos de acordo com a mudança da coloração de cada teste, indicando a positividade ou não de cada reação bioquímica. Os resultados são então traduzidos de acordo com cada fabricante, em geral em um código numérico, que posteriormente é lido através de um software também específico de cada fabricante e então é realizada a identificação do microorganismo de acordo com a grade de identificação dos respectivos kits. Os tempos de incubação variam entre 4 e 24 horas. Cada kit apresenta uma grade de identificação não necessariamente contemplando os mesmos microorganismos. Normalmente, os kits não contemplam todas as espécies válidas descritas em sua grade de identificação. De forma semelhante, os sistemas automatizados funcionam com base em cartões de identificação para grupos de microorganismos ou gêneros específicos, que tem como princípio o mesmo dos testes semiautomatizados, com exceção da interpretação dos resultados, que por sua vez é realizado por softwares incorporados ao próprio equipamento. Atualmente, dois sistemas automatizados são comumente utilizados, o Vitek2 (bioMerieux, France) e o BD Phoenix System (Becton Dickinson, USA) (BERNARD, 2012; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

### 1.5.2 Identificação molecular

Desde a década de 1980, quando a PCR foi inventada, ela tem sido utilizada para a identificação de microorganismos recuperados de amostras clínicas (ZASADA; MOSIEJ, 2018). Pallen e colaboradores (1991), através da técnica de PCR, desenvolveu um protocolo para a detecção da TD de cepas de *C. diphtheriae* através da detecção da subunidade A (biologicamente ativo). A partir de então, a técnica tornou-se amplamente difundida entre os laboratórios de todo o mundo. Outras abordagens da PCR também foram propostas ao longo dos anos, como por exemplo, a detecção de ambas as porções codificadoras da TD, e a PCR em tempo real, também utilizada para a detecção da TD (HAUSER et al., 1993; MOTHERSHED et al., 2002).

Com a aplicação da técnica de PCR, a identificação de amostras potencialmente produtoras da TD passou a ser realizada de forma muito mais rápida (5 horas) quando comparado com a técnica então utilizada, o ensaio de toxigenicidade Elek, que demora em torno de 16 horas para se obter o resultado. Outra vantagem da PCR é que pode ser realizada diretamente da amostra clínica. Entretanto, devemos considerar, como já mencionado acima, as amostras NTTB, e nesse sentido, a importância de se realizar o teste de Elek para a comprovação da produção da TD (ZASADA; MOSIEJ, 2018). Devido a importância das espécies potencialmente produtoras da TD, a diferenciação dessas espécies é imprescindível. Mancini e colaboradores (MANCINI et al., 2012) e Torres e colaboradores (2013) desenvolveram uma PCR multiplex capaz de diferenciar até então as três espécies potencialmente produtoras da TD com base no gene repressor da TD (*dtxR*), no gene codificador da fosfolipase D (*pld*) e no gene 16S rRNA, contudo, em virtude das recentes reclassificações do complexo difteria, hoje formado pelas espécies *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium rouxii* e *C. silvaticum*, as técnicas da PCR, até o momento da escrita desta tese, descritas para a detecção da TD e diferenciação das espécies potencialmente produtoras da TD, não são mais capazes de realizar a diferenciação das espécies do complexo difteria.

Outra técnica utilizada para a identificação molecular é o sequenciamento dos genes 16S rRNA e o gene *rpoB*, codificador da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (ZASADA; MOSIEJ, 2018). Estes genes serão apresentados no tópico seguinte por fazerem parte das análises taxonômicas utilizadas neste trabalho.

Atualmente, a identificação por MALDI-TOF MS tem sido utilizada com frequência, embora não seja uma realidade comum a todos os laboratórios clínicos (ALATOOM et al., 2012; ALIBI et al., 2015; BIZZINI et al., 2011). A técnica de MALDI-TOF MS é uma tecnologia de alto rendimento, baseado em perfis de proteínas em que um espectro de massas do microorganismo a ser identificado é comparado com os espectros do banco de dados do sistema para se encontrar a correspondência mais próxima. No Brasil, dois grandes sistemas são mais utilizados, MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, França) e Vitek MS (bioMérieux, França). É importante saber que os sistemas de identificação possuem preparos, banco de dados e algoritmos distintos (ZASADA; MOSIEJ, 2018). A técnica de MALDI-TOF MS sem dúvidas revolucionou o sistema de identificação de microorganismos, fazendo com que o tempo e o custo para a realização da identificação fossem reduzidos a valores significativos, considerando, sem dúvidas, no impacto que isso teria na prática clínica, com a otimização do tempo para o diagnóstico final. Dentre as possibilidades de preparo das amostras para a identificação por MALDI-TOF MS, destaca-se a transferência da colônia com a utilização do ácido fórmico e a extração com etanol/ácido fórmico, sendo este último, mais demorado e complexo (THEEL et al., 2012; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

A identificação de *Corynebacterium* spp. por MALDI-TOF MS tem se mostrado confiável tanto para nível de gênero quanto de espécie. Os valores obtidos nas identificações têm sido semelhantes ou superiores quando comparado aos métodos convencionais e de sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*, apontando que os melhores valores de identificação estão relacionados com o método de extração com etanol/ácido fórmico do que com o método de transferência direta da colônia (ALIBI et al., 2015; BARBERIS et al., 2014; THEEL et al., 2012). Contudo, as limitações desse sistema de identificação encontra-se na gama de espécies que estão contidas nos bancos de dados, levando assim a uma identificação incorreta ou impossível de ser realizada (RYCHERT, 2019; ZASADA; MOSIEJ, 2018).

## 1.6 Taxonomia bacteriana

Taxonomia bacteriana é a ciência que compreende a classificação, que se direciona para a criação de novas taxas; a identificação de isolados em espécies conhecidas; e a nomenclatura. Para que esta ciência funcione é necessário que ela esteja fundamentada em esquemas confiáveis, reproduzíveis e informativos (THOMPSON et al., 2013). As

informações taxonômicas são essenciais para compreender a biodiversidade e a relação entre os organismos de diferentes ecossistemas. Para os microorganismos procariotos, a taxonomia desempenha um papel importante ao permitir a identificação dos isolados oriundos de espécimes clínicos ou ambientais de maneira confiável (RAMASAMY et al., 2014).

Os microorganismos dominam a árvore da vida em número e diversidade, e sua classificação natural é difícil e importante. Carl Nilsson Linnæus, conhecido como o pai da taxonomia moderna, propôs um sistema binomial de classificação que é uma das bases da classificação atual dos organismos. Em animais, uma espécie é geralmente definida como um grupo de organismos que possuem a capacidade de se reproduzir e originar descendentes férteis, entretanto, essa definição não pode ser aplicada diretamente ao grupo de organismos assexuados, em contrapartida, a definição de uma espécie bacteriana é complexa (VARGHESE et al., 2015).

A taxonomia bacteriana começou a ser praticada somente no final do século XIX, quando as bactérias eram classificadas com base nos aspectos morfológicos, condições e requisitos para o crescimento e seu potencial patogênico, desta forma, a identificação de novos táxons elevou de maneira significativa, levando a sérios erros de identificação e classificação em diversos grupos bacterianos, isto porque, o método era limitado e incluía o uso de poucas características para a classificação de microorganismos (MAHATO et al., 2017; RAMASAMY et al., 2014). Posteriormente, com o surgimento de técnicas computacionais, a taxonomia numérica, que compreende na utilização do número de características comuns entre os microorganismos é considerado em uma medida quantitativa de parentesco taxonômico, começou a ser aplicada. Tal abordagem, contribuiu enormemente para a classificação e identificação de microorganismos, por exemplo, na classificação e identificação dos gêneros *Mycobacterium* e *Rhodococcus* (SANT'ANNA et al., 2019). Outra técnica que contribuiu para a taxonomia foi a *DNA-DNA Hybridization* (DDH, em português, hibridização DNA-DNA), que juntamente com outros avanços tecnológicos na área da química, como a quimiotaxonomia, que compreende a classificação e identificação de microorganismos com base nas diferenças e semelhanças bioquímicas, favoreceram para que a taxonomia de microorganismos sofresse modificações na direção de um sistema de classificação que refletisse as relações filogenéticas entre os microorganismos, aproximando-os mais de uma realidade biológica. O uso dessas técnicas direcionou a identificação bacteriana para uma nova abordagem taxonômica até hoje utilizada, denominada de taxonomia polifásica, que se baseia nos aspectos fenotípicos, quimiotaxonômicos, nas

propriedades físico-químicas do DNA e no relacionamento genético proporcionado também pelos dados oriundos do DNA (MAHATO et al., 2017).

As técnicas de amplificação e sequenciamento de DNA, na década de 1980, de modo particular, o sequenciamento do gene 16S rRNA, proposto por Woese e Fox (1977) para a reconstrução da árvore da vida, demonstraram-se extremamente úteis para o estabelecimento das relações filogenéticas e para a classificação taxonômica dos microorganismos (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). O gene 16S rRNA é um marcador eficaz para determinação das relações filogenéticas entre táxons bacterianos distantes, isto pelo fato de ser um gene onipresente e altamente conservado em bactérias. Nesse sentido, os resultados obtidos pelas análises das sequências do gene 16S rRNA são bem utilizados para a classificação taxonômica a nível de gênero, contudo algumas limitações devem ser consideradas para a classificação a nível de espécie, como a presença de múltiplas cópias no genoma bacteriano com diferenças nas sequências, a diferença de sequência intragenômica presente em alguns microorganismos e devido a sua natureza altamente conservada e baixo polimorfismo, o sequenciamento completo do gene (1500 pb) é necessário para uma identificação molecular mais precisa (MAHATO et al., 2017). Por outro lado, o sequenciamento parcial do gene *rpoB* (434-452 pb), proposto por Khamis e colaboradores (2005) é utilizado para a diferenciação de espécies dentro do gênero *Corynebacterium*, mostrando uma melhor identificação a nível de espécie quando comparado com o sequenciamento do gene 16S rRNA. Khamis e colaboradores (2005), propõe também que o sequenciamento parcial do gene *rpoB* seja utilizado de forma adjuvante ou em substituição ao sequenciamento do gene 16S rRNA. Entretanto, considerando a realidade da maioria dos laboratórios clínicos, ambas as técnicas de sequenciamento são demasiadamente caras para que seja uma abordagem amplamente utilizada na identificação de microorganismos (ZASADA; MOSIEJ, 2018). De acordo com a taxonomia bacteriana, um grupo de isolados podem ser considerados da mesma espécie quando compartilham entre si: (i) > 70% similaridade DDH; (ii) < 5°C de diferença da temperatura de desnaturação ( $\Delta T_m$ ) entre o DNA genômico durante a DDH; (iii) < 5% molaridade no conteúdo G + C entre o DNA genômico total; e (iv) >98,7% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA (MAHATO et al., 2017; STACKEBRANDT; JONAS, 2006).

A classificação bacteriana foi enormemente facilitada pelas metodologias moleculares e o sequenciamento do gene 16S rRNA é até hoje utilizado como o primeiro passo para a identificação de um microorganismo. Contudo, a revolução genômica aconteceu há 26 anos, quando o primeiro sequenciamento completo de *Haemophilus influenzae* foi realizado e o

acesso às informações genéticas se tornaram públicas. A partir desse acontecimento, diversas propostas foram feitas para auxiliar nas relações taxonômicas entre procariotos. Quase duas décadas depois já era perceptível o avanço da técnica de sequenciamento nos repositórios públicos ao redor do mundo, onde o montante de genomas sequenciados passava de seis mil (RAMASAMY et al., 2014).

A abordagem polifásica se mostrou um método eficaz na classificação de procariotos mesmo antes do surgimento de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, entretanto, necessita de cautela devido às limitações que com o avanço tecnológico foi possível observar, tais como, ambiguidades nas atribuições taxonômicas frente aos dados genômicos e a limitação na classificação entre cepas estreitamente relacionadas (MAHATO et al., 2017; VARGHESE et al., 2015). Nesse sentido, após o estabelecimento do sequenciamento do genoma completo, que antigamente era restrito pelo seu alto custo, foi possível estabelecer esquemas taxonômicos baseados nas informações evolutivas contidas no genoma bacteriano, atrelando a taxonomia microbiana cada vez mais ao sequenciamento genômico do que a taxonomia polifásica, principalmente no que diz respeito às características fenotípicas e aos testes amplamente utilizados que demandam tempo para a sua realização (THOMPSON et al., 2013). Em virtude desses acontecimentos, uma nova era se iniciou, a era da taxonomia genômica microbiana, com a utilização de diversas ferramentas e notória aceitação na comunidade de pesquisa que é evidenciada pelo número de manuscritos que utilizam esse novo método taxonômico como base para descrição de novos táxons, identificação ou reclassificações. Contudo, a taxonomia genômica microbiana ainda não é um consenso, e portanto não se define como uma abordagem taxonômica de fato, embora seja recomendada atualmente como parte fundamental para a descrição de novos táxons (COENYE et al., 2005; TANG, 2020; THOMPSON et al., 2013).

#### 1.6.1 Taxonomia genômica

A taxonomia genômica é definida com base em uma abordagem genômica comparativa integrada com o objetivo de extrair informações taxonômicas do sequenciamento de alto rendimento, visando estabelecer uma estrutura sólida para a identificação e classificação de espécies procariotas. Fazem parte das análises da taxonomia genômica microbiana, por exemplo: DDH *in silico*; identidade média de aminoácidos (AAI, em inglês,

*Average Amino acid Identity*); identidade média de nucleotídeos (ANI, em inglês, *Average Nucleotide Identity*); *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA, em português, análise da sequência de múltiplos *loci*); e análise da superárvore (THOMPSON et al., 2013).

A DDH é um modelo experimental em que o genoma de duas amostras, sendo uma delas a cepa tipo marcada, são fragmentados entre 600 e 800 pares de base e, através do aquecimento, as fitas de DNA são dissociadas e imediatamente reassociadas, ocorrendo a hibridização. O grau de relação entre dois genomas é verificado e é considerado como pertencente a mesma espécie caso ocorra a hibridização de pelo menos 70% e uma diferença na temperatura média de desnaturação de até 5°C entre os genomas analisados. Sua primeira aplicação ocorreu nos anos 60 e desde então essa técnica é considerada o padrão-ouro para a definição de espécies de bactérias (CHUN; RAINEY, 2014; SANT'ANNA et al., 2019). Por se tratar de uma técnica laboriosa, lenta, cara e que requer mão de obra especializada para sua realização, o seu uso é limitado a poucos laboratórios. Além disso, os resultados da DDH variam de acordo com a metodologia utilizada, podendo apresentar erros experimentais e a comparação dos resultados obtidos por diferentes metodologias não são recomendados. Outra limitação importante da DDH é que não houve consistência em relação ao ponto de corte de 70% para delimitação de espécie para todos os gêneros bacterianos, como por exemplo para as espécies *Rickettsia rickettsi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia sibirica* e *Rickettsia montanensis* (SANT'ANNA et al., 2019; SENTAUSA; FOURNIER, 2013; TINDALL et al., 2010).

Com o objetivo de otimizar a DDH e considerando as informações genômicas disponibilizadas nos repositórios públicos, novas ferramentas de bioinformáticas foram criadas para fins taxonômicos a fim de acrescentar a técnica clássica de DDH pela técnica *in silico* (CHUN et al., 2018; CHUN; RAINEY, 2014). A análise realizada *in silico* é baseada em alinhamento local em que são geradas correspondências intergenômicas que servem posteriormente para calcular a matriz de distância que são convertidos em valores análogos a DDH. Atualmente a DDH é recomendada em situações em que a similaridade da sequência do gene 16S rRNA é superior a 97% entre as cepas analisadas (SANT'ANNA et al., 2019).

Outra ferramenta bastante utilizada para a classificação e identificação de espécies bacterianas com um uso crescente ao longo dos anos é a ANI, inclusive essa ferramenta apresenta forte correlação com a DDH. A ANI é baseada no alinhamento local cuja média aritmética da porcentagem de identidade de todos os genes codificadores de proteína que são conservados entre duas cepas bacterianas é representada. O ponto de corte para a correlação de espécies é de 95% de identidade (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014). Para tanto, as regiões consideradas conservadas devem apresentar uma correspondência de ao

menos 60% de identidade de sequência geral e uma região alinhável maior que 70% do seu comprimento no genoma de referência.

Para análises entre cepas de gêneros distintos, recomenda-se o uso de ferramentas alternativas (SANT'ANNA et al., 2019). Deste modo, outra métrica também utilizada para a classificação e identificação de espécies é a AAI. Ao invés de nucleotídeos, a AAI analisa sequências de aminoácidos também por alinhamento local. As particularidades para as considerações das regiões conservadas são as mesmas da ANI, inclusive na porcentagem requerida para que as espécies sejam correlacionadas (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014).

Diferentes genes quando analisados individualmente, podem indicar diferentes histórias evolutivas que diverge da história filogenética de uma determinada espécie. Isso se relaciona diretamente às diversas transferências horizontais e recombinações que podem ocorrer em um determinado microorganismo (COENYE et al., 2005; SANT'ANNA et al., 2019). Igualmente como utilizamos o gene 16S rRNA para analisarmos a similaridade entre duas espécies, assim também é possível utilizar a sequência do genoma para construir árvores filogenéticas mais robustas para que seja possível se basear a classificação taxonômica. Duas diferentes abordagens que envolvem as sequências do genoma para a análise filogenética de forma mais robusta são: a superárvore e a MLSA (HUGENHOLTZ et al., 2021).

A superárvore é uma abordagem filogenética que ao longo dos últimos anos tem se modificado de forma importante, contemplando técnicas mais objetivas e capazes de produzirem inferências filogenéticas mais evidentes, passando a ser considerada como um tópico oportuno. Esses aprimoramentos foram inclusive considerados como uma possibilidade para a reconstrução da árvore da vida (BININDA-EMONDS, 2004; HUGENHOLTZ et al., 2021). Para a construção da superárvore, árvores gênicas independentes são criadas e combinadas de forma que se obtenha uma análise única e consensual das relações filogenéticas entre os microorganismos analisados.

A MLSA, por sua vez, se baseia na análise da sequência de um número determinado de genes conservados codificadores de proteínas, incorporando os valores de similaridade na análise para fazer a diferenciação as espécies (CHUN; RAINEY, 2014; SANT'ANNA et al., 2019). A análise é realizada alinhando e concatenando as sequências de genes conservados que são utilizadas para a construção de uma árvore filogenética com o intuito de separar as espécies em clados distintos. Um ponto importante para que a análise seja confiável é em relação a escolha dos genes conservados para cada táxon analisado. Recomenda-se que os genes sejam distribuídos ao longo de todo o genoma e que estejam presentes em cópia única,

além de também apresentarem tamanhos curtos de sequências, principalmente para que o sequenciamento seja facilitado. Frequentemente são escolhidos genes essenciais para a realização da MLSA, por estarem presentes em todas as espécies de um gênero e por apresentarem uma evolução lenta (COENYE et al., 2005; SANT'ANNA et al., 2019). O uso de ao menos cinco genes conservados é aconselhado pelo comitê *ad hoc* para reavaliação da definição de espécie em bacteriologia, embora a maioria dos estudos utilizam sete genes para a realização da técnica. Algumas espécies requerem o uso de mais genes para melhor diferenciação (SANT'ANNA et al., 2019).

É importante destacar que atualmente com o avanço obtido no sequenciamento de alto rendimento, que se mostrou uma metodologia rápida e fácil, e na computação de alto desempenho, a MLSA tornou-se possível de ser realizada *in silico* uma vez que aumentou consideravelmente a disponibilidade de genomas completos em repositórios públicos permitindo que as sequências dos genes conservados pudessem ser extraídas diretamente dos respectivos genomas (SANT'ANNA et al., 2019; HUGENHOLTZ et al., 2021).

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O potencial patogênico de microorganismos do gênero *Corynebacterium* com exceção do agente etiológico da difteria clássica, *C. diphtheriae* permanece subestimado. Entretanto, o crescente aumento de casos infecciosos em humanos por espécies potencialmente não produtoras da TD descritos nas últimas décadas têm chamado a atenção de profissionais de saúde e pesquisadores do assunto. Atualmente, algumas espécies do gênero *Corynebacterium* já têm sido consideradas patogênicas para determinadas doenças, sobretudo em pacientes imunocomprometidos. Dentre essas espécies, destaca-se no âmbito desse trabalho o *C. urealyticum* como agente causador de ITU e com a capacidade de apresentar resistência a diversos agentes antimicrobianos.

Entretanto, tem emergido nas últimas décadas o isolamento de *Corynebacterium spp.* em urinoculturas, sobretudo naquelas provenientes de pacientes imunocomprometidos, de indivíduos com longo tempo de internação ou transplantados. Nota-se também que algumas destas espécies isoladas de urinoculturas tiveram seu primeiro isolamento descritos como agentes infecciosos em outros sítios que não o sistema urinário.

O avanço da tecnologia nos últimos anos, principalmente na área da biologia molecular e mais especificamente no sequenciamento genômico têm favorecido a descrição de novos táxons e *taxa*, ampliando o conhecimento da diversidade de microorganismos e dos mecanismos de patogenicidade em diversos hospedeiros, sejam humanos ou animais. Além disso, esses avanços nos orientam na classificação de microorganismos com metodologias *in silico* de baixo custo e fácil análise.

Deste modo, permanecem necessárias as investigações que caracterizem isolados de *Corynebacterium spp.* de urinoculturas, para permitir a identificação da predominância de espécies patogênicas envolvidas nas ITU humanas. Adicionalmente, a pesquisa dos mecanismos multifatoriais de virulência destes isolados clínicos e o conhecimento dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos tornam-se imprescindíveis com impacto direto no planejamento das ações terapêuticas das infecções tanto das infecções comunitárias quanto nosocomiais.

## 2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral a investigação de *Corynebacterium* spp. isoladas de urinoculturas através da caracterização fenotípica e molecular, incluindo aplicação da taxonomia polifásica e genômica, além da avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e análise de mecanismos de virulência.

## 2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar por diferentes métodos de diagnóstico fenotípicos (bioquímica convencional e sistemas API® Coryne) e moleculares (MALDI-TOF MS e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*) seis cepas de *Corynebacterium* spp. isoladas de urina humana;
- b) Sequenciar, montar e anotar o genoma completo dessas cepas potencialmente patogênicas isoladas de urina;
- c) Aplicar a abordagem polifásica e genômica no estudo taxonômico dos seis isolados de *Corynebacterium* deste trabalho;
- d) Determinar os perfis de susceptibilidade do isolado clínico raro *Corynebacterium mycetoides* aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão em disco de acordo com o BrCAST;
- e) Investigar o potencial patogênico da espécie rara *C. mycetoides* utilizando modelos experimentais *in vitro*, como formação de biofilme em substratos abióticos diversos e interação com células epiteliais renais, e *in vivo* com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

### 3 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram organizados em três artigos científicos apresentados a seguir:

Artigo 1: **Lincoln Sant’Anna**, Louisy Santos, Max Roberto Araújo, Danilo Rocha, Juliana Ramos, Paulo Victor Baio, Pedro Peloso, Cassiana Leite, Renata Stavrakakis, Marisa Almuzara, Carlos Vay, Claudia Barberis, Vartul Sangal, Andreas Burkovski, Eric Roberto Aguiar, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Luis Gustavo Pacheco, Verônica Vieira. ***Corynebacterium guaraldiae* sp. nov., a new species of *Corynebacterium* from human infections.** (Artigo submetido ao periódico *Internation Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* – Fator de impacto 2.4 – Qualis A2).

Artigo 2: **Lincoln de Oliveira Sant’Anna**, Louisy Sanches dos Santos, Sara Wilis Cussuol Gomes, Max Roberto Batista Araújo, Juliana Nunes Ramos, Paulo Victor Pereira Baio, Pedro Guimarães Coscarelli, Ana Luíza Mattos-Guaraldi, Verônica Viana Vieira. ***Corynebacterium hiratae* sp. nov. isolated from a human urine and proposal the revived name from *Corynebacterium nigricans* Shukla et al., 2003 pro synonym. *Corynebacterium aurimucosum* for *Corynebacterium nigricans* (ex. Shukla et al., 2003) nom. rev.** (Artigo em fase de submissão).

Artigo 3: **Lincoln Sant’Anna**, Elisabete Cappelli, Max Roberto Araújo, Juliana Ramos, Liliane Simpson-Lourêdo, Andrezza Cucinelli, Louisy Santos, Verônica Vieira, Ana Luíza Mattos-Guaraldi. **Virulence potential of the first *Corynebacterium mycetoides* strain isolated from human urine: a rare species of *Corynebacterium*.** (Artigo submetido ao periódico *Microbes and Infection* – Fator de impacto 2.7 – Qualis A2).

### 3.1 Artigo 1: *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov., uma nova espécie de *Corynebacterium* de infecções humanas.

As *Non-diphtheria Corynebacterium* (NDC, em português, espécies de *Corynebacterium* não difteria) pertencentes à microbiota humana de pele e mucosa são frequentemente negligenciadas como contaminantes. No entanto, relatos de infecções humanas por *Corynebacterium* spp. aumentaram consideravelmente nos últimos anos. Neste estudo, um grupo de seis isolados NDC de urina (n = 5) e cisto sebáceo (n = 1) de dois países da América do Sul foram identificados em nível de gênero ou erroneamente identificados por API® Coryne, MALDI-TOF MS e pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*. As semelhanças nas sequências dos genes 16S rRNA (99,09% - 99,56%) e *rpoB* (96,18% - 97,14%) dos isolados foram maiores quando comparados com *Corynebacterium aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>. A MLSA indicou que os seis isolados de NDC compõem um clado filogenético distinto. A análise taxonômica baseada no genoma com todas as sequências do genoma foi capaz de separar os seis isolados de outras cepas tipo de *Corynebacterium* conhecidas. Os valores da identidade média de nucleotídeos (ANI), identidade média de aminoácidos (AAI) e hibridização digital de DNA-DNA (dDDH) entre cepas tipo intimamente relacionadas e os seis isolados foram consideravelmente mais baixos do que os valores de limiar atualmente recomendados para circunscrição de espécies. Análises filogenéticas e taxonômicas genômicas indicaram esses microorganismos como uma nova espécie de *Corynebacterium*, para a qual propomos formalmente o nome *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. com a cepa 85<sup>T</sup> como cepa tipo.

**Title page**

***Corynebacterium guaraldiae* sp. nov., a new species of *Corynebacterium* from human infections**

**Lincoln de Oliveira Sant'Anna<sup>1\*</sup>, Louisy Sanches dos Santos<sup>1</sup>, Max Roberto Batista Araújo<sup>2</sup>, Danilo Jobim Passos Gil da Rocha<sup>3</sup>, Juliana Nunes Ramos<sup>1,4</sup>, Paulo Victor Pereira Baio<sup>5</sup>, Pedro Fernandez Del Peloso<sup>6</sup>, Cassiana da Costa Ferreira Leite<sup>6</sup>, Renata Stavrakakis Peixoto<sup>7</sup>, Marisa Almuzara<sup>8</sup>, Carlos Vay<sup>8</sup>, Claudia Barberis<sup>8</sup>, Vartul Sangal<sup>9</sup>, Andreas Burkovski<sup>7</sup>, Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar<sup>10</sup>, Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>, Luis Gustavo Carvalho Pacheco<sup>3</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Hermes Pardini Institute, Vespasiano, Brazil.

<sup>3</sup>Institute of Health Sciences, Department of Biotechnology, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil.

<sup>4</sup>Interdisciplinary Laboratory of Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>5</sup>Army Chemical and Pharmaceutical Laboratory, Ministry of Defense, Brasília, Brazil.

<sup>6</sup>Richet Laboratory, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>7</sup>Professur fuer Mikrobiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany.

<sup>8</sup>Faculty of Pharmacy and Biochemistry and Bacteriology, Department of Clinical Biochemistry, University of Buenos Aires, Autonomous City of Buenos Aires, Argentina.

<sup>9</sup>Faculty of Health and Life Sciences, Northumbria University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.

<sup>10</sup>Virus Bioinformatics Laboratory, Center of Biotechnology and Genetics, Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz, Ilhéus, Brazil.

**\*Corresponding author:**

Lincoln O. Sant'Anna

[lincolnsantanna.microuerj@gmail.com](mailto:lincolnsantanna.microuerj@gmail.com)

**Keywords:** *Corynebacterium*; *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov.; urinary tract infection; epidermal cyst; classification.

**Repositories:**

The accession numbers of whole genome shotgun sequences of isolates included in this study were deposited at GenBank Database under following access numbers: VIOF000000000.1; VHIS000000000.1; VKDH000000000.1; VKDJ000000000.1; VKDG000000000.1; VKDI000000000.1 and CP071874.

## Abstract

Non-diphtheria *Corynebacterium* species (NDC) belonging to the human skin and mucosa microbiota are frequently neglected as contaminants. However, reports of human infections by *Corynebacterium* spp. have increased considerably in recent years. In this study, a group of six NDC isolates of urine (n = 5) and sebaceous cyst (n = 1) from two South American countries were identified at genus level or misidentified by API® Coryne, MALDI-TOF MS, 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing assays. The 16S rRNA (99.09% - 99.56%) and *rpoB* (96.18% -97.14%) gene sequence similarities of the isolates were higher when compared with *Corynebacterium aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) indicated that these six NDC isolates compose a distinctive phylogenetic clade. Genome-based taxonomic analysis with the whole genome sequences was able to separate these six isolates from other known *Corynebacterium* type strains. Average nucleotide identity (ANIb), average amino acid identity (AAI) and digital DNA–DNA hybridization (dDDH) values between closely related type strains and the six isolates were considerably lower than the currently recommended threshold values for species circumscription. Phylogenetic and genomic taxonomy analyses indicated these microorganisms as a novel *Corynebacterium* species, for which we formally propose the name *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. with 85<sup>T</sup> as type strain.

## Introduction

The genus *Corynebacterium* comprises Gram-positive rods of irregular shape, characterized with aerobic growth, acid-fast staining and a lack of spore formation (1). Currently, there are approximately 128 valid species (2). *Corynebacterium diphtheriae*, besides being the type species, is the most well studied species of genus and the causative agent of classic diphtheria worldwide. Non-diphtheria *Corynebacterium* (NDC) are found as constituents of human skin and mucous membranes microbiota and several species of NDC have been increasingly implicated as causative agents of opportunistic and nosocomial infections (3–6). Despite the increase in the number of reports of serious infections by NDC, these microorganisms have still been often neglected and the pathogenic potential are not characterized (7). Conventional and commercial devices present limitations and fail to carry out differentiating *Corynebacterium* species and an accurate identification (8). The implementation of microbial identification by matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical laboratories has become the faster and most reliable *Corynebacterium* spp. identification method (7–9). Although sequencing of 16S rRNA gene has been widely employed to bacterial identification, partial *rpoB* gene sequencing has shown more discriminating power for NDC identification than 16S rRNA gene sequence analysis (7,10). Current bacterial taxonomy has been based on a polyphasic approach, which integrates phenotypic, genotypic, phylogenetic analysis, and genomic analysis (11). The aim of this study was to define the taxonomic position of six isolates from human infections, misidentified as *Corynebacterium aurimucosum* by partial *rpoB* and almost complete 16S rRNA genes sequence analysis and other laboratorial methods used during routine laboratory diagnosis.

## Materials and Methods

### Bacterial isolate

Six isolates of Gram-positive rods from urine samples (n = 5) and sebaceous cyst (n = 1) (Table 1) from Brazil and Argentina during a period of 6 years (2011-2017) were identified in parallel studies at Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance of State University of Rio de Janeiro and Clinical Bacteriology Laboratory of University of Buenos Aires. Both laboratories submitted the isolates to the commercial test API® Coryne system (BioMérieux, France), according to the manufacturer's guidelines, using the APIWEB™ version 3.0, for a reliable interpretation of API strip results. Additionally, the isolates were submitted to the MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex®, Bruker Daltonics, France), following the protocol as described previously (12), and using the Maldi Flex Control software analysis and Maldi Biotyper software, both version 3.0.

### Genotypic identification by 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing and phylogenetic analysis

The amplification of 16S rRNA and *rpoB* genes were performed according with protocols previously described (13). The genes sequences were compared to type strains sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm and/or the EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) server using the 16S-basedID application (14). The gene sequences were aligned by ClustalX2 (15) and phylogenetic analysis was performed using the MEGA X program (version 10.2.6) (16).

## Genome sequencing, assembly, and annotation

Genome sequencing was performed by Ion Torrent S5 platform, using Ion 540™ Chip to 200 bp libraries (ThermoFisher Scientific) at Department of Biotechnology of Institute of Health Sciences at Federal University of Bahia. The gDNA libraries were prepared according to manufacturer's protocol for enzymatic fragmentation (50 ng to 100 ng) of DNA, using Ion Xpress™ Plus Fragment Library kit. To distinguish samples, Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit was applied. To select the proper fragmented size, the EGel™ SizeSelect™ Agarose Gel was used, following stain migration, in real time, with a 2% agarose gel for the time suggested in the manufacturer's protocol. All samples purification steps were made through ProNex® Size-Selective Purification System kit (Promega) at the ratio 2:1 of magnetic beads. To library equalization, Ion Library Equalizer™ Kit was applied. Template preparation to sequencing followed strictly the protocol for Ion 540™ Kit – OT2, Ion 540™ Chip, Ion OneTouch™ and Ion OneTouch™ ES instruments. All mass values for DNA, when needed, were obtained by Qubit®. The raw sequenced data obtained from each sample were collected again using SPAdes (version: 3.10.0) and annotation was performed using Rapid Annotation using System Technology (RAST) (17).

## Multilocus sequence analysis

Multilocus sequence analysis (MLSA) was performed using complete sequences of the following seven housekeeping genes: ATP synthase alpha chain (*atpA*), DNA polymerase III alpha subunit (*dnaE*), chaperone protein (*dnaK*), elongation factor G (*fusA*), 2-isopropylmalate synthase (*leuA*), 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 and E2 components (*odhA*) and DNA-directed RNA polymerase beta chain (*rpoB*). The seven housekeeping gene sequences of their closest relatives were directly downloaded from GenBank or retrieved from draft/complete genome sequences. All these genes were concatenated in head to tail form

(*atpA-dnaE-dnaK-fusA-leuA-odhA-rpoB*) and exported in FASTA format, providing a dataset of 81 strains and 116,432 nucleotides in final dataset. Pairwise distance was calculated by Kimura 2 parameter models (18). Phylogenetic trees were reconstructed with the maximum-likelihood method using the general time reversible model with Gamma distribution combined with the proportion of invariable sites (GTR+G+I) (19).

### Genomic taxonomy

To carry out the taxonomic analysis we used whole genome sequences of type strains *C. aurimucosum* DSM 44532 (CP071874), *Corynebacterium minutissimum* NCTC 10288 (LS483460.1), *Corynebacterium singulare* IBS B552218 (CP010827.1) and reference strain *C. aurimucosum* ATCC 700975 (NC012590.1) downloaded from the GenBank Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). The degree of genomic similarity of the species was estimated according to described previously (20). *In silico* DNA-DNA hybridization (DDH) was performed to evaluate the genomic similarity together with Genome-to-Genome Distance Hybridization (GGDH), the Average Nucleotide Identity (ANI)/Average Amino Acid Identity (AAI) and whole-genome-based taxonomic analysis. *In silico* DDH values were determined by Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>) (21). ANI/AAI were carried out through the online platform Environmental Microbial Genomics Laboratory based on ANI Calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) and AAI Calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>) tools (22,23). Whole-genome-based taxonomic analysis was performed by Type Strain Genome Server (<https://tygs.dsmz.de>) (TYGS) (24).

## Accession numbers

The accession numbers of whole genome shotgun sequences of isolates 13, 85<sup>T</sup>, 2218, 2226, 2271, 2299 and DSM 44532<sup>T</sup> were deposited at GenBank under the accession VIOF000000000.1, VHIS000000000.1, VKDH000000000.1, VKDJ000000000.1, VKDG000000000.1, VKDI000000000.1 and CP071874, respectively.

## Results and Discussion

The ever-increased adoption of next-generation sequencing technologies has prompted whole-genome based taxonomy studies, and, has been changing the understanding of the clinical impact of some species of *Corynebacterium*, that which were previously considered as opportunistic microorganisms or contaminants of clinical materials. Recently, new species were described involving infections in humans, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium furnieri*, *Corynebacterium gottingense*, *Corynebacterium rouxii*, *Corynebacterium urinipleomorphum* and *Corynebacterium sanguinis*. Although *C. sanguinis* has been described in the last year, several isolates were recovered from bone, wound and blood since 1999 (25–29). In addition, other species also emerged as causative agents of human infections in recent decades, such as *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium urealyticum*, both with some isolates presenting a multidrug-resistant phenotype (4,30–32).

The biochemical identification of *Corynebacterium* spp. is problematic to clinical microbiology laboratories, as most isolates remain identified only at the genus level. Therefore, commercial identification systems are unreliable for definitive identification of NDC (7,33). Adderson et al. (2008) analyzed three identification systems: API® Coryne, RapID™ CB PLUS system and BBL™ Crystal™ Gram-Positive ID Kit, and revealed that API® Coryne, although with some limitations, proved to have the highest sensitivity. In this

study, six NDC isolates were recovered from different sites and sources. Interestingly, the isolates were predominantly from urine, except for the most recent isolate that was recovered from the skin. Most isolates (n=4) were from individuals with kidney problems (Table 1).

All isolates were misidentified as *C. striatum* / *Corynebacterium amycolatum* by API® Coryne system, including the *C. aurimucosum* type strain (Table 2). The results had varied identification statuses related to percentage of identification of the test. One isolate was identified as "doubtful profile" indicating that possibly the isolate is considered a very atypical profile, two were identified as "acceptable identification" ( $80 \leq \%ID \leq 90$ ) and one was identified as "good identification" ( $90 \leq \%ID \leq 99$ ) (Table 2). Failures in bacterial identification by API® Coryne have been reported in some studies. However, these isolates were misidentified due to close phenotypic relationship with *C. aurimucosum* strains, species not included in database of API® Coryne system. Moreover, the isolates in this study belong to an as-yet-unidentified species (33).

MALDI-TOF technology is extensively used in identifying clinical microorganisms (34). In this study, the use of MALDI-TOF resulted in the identification of isolates as *Corynebacterium* genus with scores ranging between 1.868 and 2.091. Therefore, if we consider that species-level identifications according to the manufacturer would be reliably accepted when scores  $\geq 2.000$  are obtained, two isolates were misidentified as *C. aurimucosum* (Table 1). Previous studies have suggested scores  $\geq 1.700$  would be appropriately reliable for species identification for *Corynebacterium* spp. (35,36). However, low scores of MALDI-TOF system were not successful in identifying the microorganisms in this work, mistakenly identifying them as being closely related species (Table 1). On the other hand, the MALDI-TOF system allows the inclusion of chromatographic profiles in the database to increase the identification capacity. Therefore, an update of the database with spectra profiles of this new species can provide the correct identification by MALDI-TOF.

For a few decades, the use of 16S rRNA gene sequence analysis has significantly facilitated the differentiation of *Corynebacterium* species. The threshold value established for the circumscription of bacterial species is 98.70 % similarity with the 16S rRNA gene sequence (37). Khamis et al. (2004) also proposed the use of partial sequencing of the *rpoB* gene to replace or complement the analyses performed by sequencing the 16S rRNA gene, with a cut-off point of 95%. The 16S rRNA gene sequence analysis showed similarity above 99.00 % among all our isolates and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>. When the 16S rRNA gene sequences of our isolates were compared to those of *C. minutissimum* NCTC 10288<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup>, the similarity values found were between 98.76-99.29 % and 98.83-99.29 %, respectively. When the partial sequences of the *rpoB* gene were analyzed, the isolates shared 96.18 to 97.14 % with their closest neighbor *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>, and with *C. minutissimum* NCTC 10288<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> showed a similarity of 93.56-94.27 % and 94.03-94.27 % (Table 1). The almost complete sequences of the 16S rRNA gene analysis selected three possible taxa. These results corroborate the study conducted by Khamis et al. (2005) demonstrating that the use of this technique for *Corynebacterium* species identification is limited due to low polymorphism of the 16S rRNA gene. Some *Corynebacterium* spp. present similarity values above the acceptable cut-off points for this gene when compared to each other, such as, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* / *Corynebacterium propinquum* and *Corynebacterium minutissimum* / *C. aurimucosum*. On the contrary, the results obtained through the partial sequencing of *rpoB* identified the clinical isolates as belonging to the species *C. aurimucosum* (similarity  $\geq 95$  %). However, taxonomic analyses showed that the isolates belong to a new species of *Corynebacterium*. These data make us reflect on the possibility of determining another cut-off value for the use of partial sequence analysis of the *rpoB* gene in the identification of species of this bacterial genus.

Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene revealed a new cluster forming a branch close to species *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> with a high value of bootstrap (Figure 1). The *rpoB* gene phylogenetic analysis also confirmed the grouping of clinical isolates close to *C. aurimucosum* (Figure 2). A more comprehensive view of the new species position represented by the type strain in the *Corynebacterium* genus based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA and *rpoB* gene sequences is shown in the supplementary material. To confirm the phylogenetic placement of these isolates, MLSA using seven protein-coding genes was performed. The resulting tree showed that our isolates are distinguishable from related type species, supporting the phylogenetic placement of the strains as a new species (Figure 3).

The average size of six genomes was 2.69 Mb. All genomes had predicted G+C contents with less than 1% differences, reinforcing that these isolates belong to the same species. The sequencing process of strain 85<sup>T</sup> rendered 4,491,223 reads with a coverage of 222 X. The assembly produced 55 contigs with a total of 2,669,544 bp, N50 of 111,082 bp; the longest contig is 254,570 bp. The metrics of draft genome sequencing for all isolates and general features of strain 85<sup>T</sup> genome and others provided by RAST were shown in Table 3.

In silico DDH (%) values among the *Corynebacterium guaraldiae* genomes sequences and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> were 34.40-34.80 % and with the reference strain of *C. aurimucosum*, ATCC 700975 ranged from 35.90-36.40 %. The values obtained between the six genomes sequences and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> ranged from 24.50-24.90 %. In silico DDH between *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> was 24.50 % (Table 4). In addition, in silico DDH between ATCC 700975 and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> were 50.30 and 24.90 % respectively, the proposed specie boundary for prokaryotes > 70 % in this analysis (20). AAI (%) between the genome sequences and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and ATCC 700975 were 91.41-92.19 % and 91.98-92.67 %, respectively. When *C. guaraldiae* genomes were compared with *C. singulare*

IBS B52218<sup>T</sup>, the values obtained for AAI were 86.29-86.63 %. AAI between *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> were 86.52 %. AAI between ATCC 700975 and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> were 95.29 and 86.58 %, respectively. ANI (%) analysis between *C. guaraldiae* genomes and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> was 87.55-87.70 % and ATCC 700975 was 88.22-88.46 % (Table 4). These values were lower when compared with *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> (83.14-83.64 %). ANI between *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> was 83.04 %. ANI between ATCC 700975 and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> were 92.53 and 83.12 %, respectively. The values proposed species boundary for prokaryotes is 95 % for AAI and ANI (20). The AAI and ANI results correlated well with the estimated DDH values. The values obtained by the analyses contained in Table 4 when compared with strains type *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> and *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup> do not reach the cut-off points necessary to classify as belonging to the same species as previously proposed (20).

In addition, the phylotaxonomic tree constructed on the TYGS server provided evidence for distinct taxonomic position of these isolates within the genus *Corynebacterium* (Figure 4). This result corroborates the results obtained by phylogenetic analyses carried out with the 16S rRNA, *rpoB* genes and MLSA analysis in which it is possible to observe the formation of distinct clade like observed in this phylotaxonomic tree.

Considering all data discussed above, the microorganisms analyzed in this study represent a new taxon of the genus *Corynebacterium*, which we propose to name *Corynebacterium guaraldiae* with isolate 85<sup>T</sup> as type strain.

**Description of *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov.**

*Corynebacterium guaraldiae* (gua.ral.di'.ae. N.L. gen. fem. n. guaraldiae, of Ana Luíza de Mattos Guaraldi, a Brazilian scientist and professor at State University of Rio de Janeiro who made great contributions to Brazilian and world science regarding the surveillance and virulence of diphtheria and other corynebacterial infections). The characteristics described below are based on the six isolates comprised in this study.

Cells are Gram-positive, non-acid-fast, non-spore-forming, non-mobile, growth in aerobic conditions (24-48 hours). Cream, mucoid, circular, smooth, and medium colonies (up to 2 mm in diameter) were observed after 24 hours of incubation on a 5 % sheep blood agar medium, at 37 °C. The isolates were found to be catalase, and pyrazinamidase positive, and nitrate, urease, esculin, oxidase and hydrolyzed gelatin were found to be negative. Activities of  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase, and  $\beta$ -glucosaminidase were not detected. Half of the isolates were observed to be positive for pyrrolidonyl arylamidase and alkaline phosphatase. Regarding the acid production capacity, they were observed for glucose and maltose, but not for lactose, mannitol, ribose, xylose, and glycogen. Most isolates showed the ability to produce acid from sucrose.

The genome size of isolate 85<sup>T</sup> is estimated at 2.66 Mb with 61.1 mol % of G + C content. The genome is deposited in GenBank under access number VHS00000000.1. The type strain is 85<sup>T</sup>, isolated in 2011 from urine sample in Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **Authors Contributions**

**LOS:** Data curation; Formal analysis; Writing-original draft; Writing-review and editing; Investigation; Visualization. **LSS:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing. **MRBA:** Writing-original draft; Investigation; Visualization. **DJPR:** Data curation; Formal analysis; Methodology. **JNR:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing. **PVPB:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing. **PFDP:** Writing-review and editing; Investigation; Resources. **CCFL:** Writing-review and editing; Investigation. **RPS:** Writing-original draft; Investigation. **MA:** Writing-review and editing; Investigation; Validation. **CV:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing; Investigation; Methodology; Resources. **CB:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing; Investigation; Methodology. **VS:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing; Resources; Visualization; Validation. **AB:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing; Resources; Visualization; Validation; Funding acquisition. **ERGRA:** Data curation; Formal analysis; Methodology. **ALMG:** Conceptualization; Writing-review and editing; Resources; Visualization; Funding acquisition. **LGCP:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing; Investigation; Methodology; Resources; Visualization; Validation; Funding acquisition; Project administration. **VVV:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing; Investigation; Methodology; Resources; Visualization; Validation; Funding acquisition; Project administration; Supervision.

### **Funding information**

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Do Ensino Superior (CAPES) # 88882.450376/2019-01, and # 88882.315426/2019-01, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) # E-26/202.087/2020, # E-26/210.889/2019, and # E-26/211.629/2015, Fundação Oswaldo Cruz (INOVA/FIOCRUZ) # 7481297331, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) # 309948/2018-5, and Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT) # 20020170100109 BA.

### **Acknowledgments**

We offer our deepest thanks to Raphael Hirata Jr. (In Memoriam), our eternal teacher and source of inspiration and to Rafael Sanches for his availability in advising on editing the image of this study. In addition, we thank CNPq for the research fellowship granted to LGCP.

## References

1. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J Clin Microbiol. 2012;50(10):3152–8.
2. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Nov;70(11):5607–12.
3. Ramos JN, Souza C, Faria YV, da Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. BMC Infect Dis. 2019 Jul;19(1):672.
4. Nudel K, Zhao X, Basu S, Dong X, Hoffmann M, Feldgarden M, et al. Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen of immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Sep;24(9):1016.e7-1016.e13.
5. Sokol-Leschczynska B, Leszczynski P, Lachowicz D, Rostkowska O, Niemczyk M, Piecha T, et al. *Corynebacterium coyleae* as potential urinary tract pathogen. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2019 Jul;38(7):1339–42.
6. Yatera K, Mukae H. *Corynebacterium* species as one of the major causative pathogens of bacterial pneumonia. Vol. 58, Respiratory investigation. Netherlands; 2020. p. 131–3.
7. Zasada AA, Mosiej E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. Lett Appl Microbiol. 2018 Jun;66(6):472–83.
8. Bao R, Gao X, Hu B, Zhou Z. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: A powerful tool for identification of *Corynebacterium* species. J Thorac Dis. 2017;9(9):3239–45.

- 399 9. Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, Ramírez MS, Famiglietti A, Vay C. Comparison  
 400 of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods  
 401 for identification of Gram-positive rods. PLoS One. 2014;9(9):1–6.
- 402 10. Khamis A, Raoult D, Scola B La. Comparison between rpoB and 16S rRNA Gene  
 403 Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*.  
 404 2005;43(4):1934–6.
- 405 11. Chun J, Rainey FA. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the  
 406 Bacteria and Archaea. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64(PART 2):316–24.
- 407 12. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, et al. Formic acid-  
 408 based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper  
 409 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol.  
 410 2012 Sep;50(9):3093–5.
- 411 13. Baio PVP, Mota HF, Freitas AD, Gomes DLR, Ramos JN, Sant’Anna LO, et al. Clonal  
 412 multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de  
 413 Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;
- 414 14. Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: a  
 415 taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.  
 416 Int J Syst Evol Microbiol. 2017 May;67(5):1613–7.
- 417 15. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X  
 418 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality  
 419 analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997 Dec;25(24):4876–82.
- 420 16. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary  
 421 Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 2018 Jun;35(6):1547–9.
- 422 17. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server:  
 423 rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. 2008 Feb; 9:75.

- 424 18. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions  
425 through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980 Dec;16(2):111–20.
- 426 19. Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford Press U, editor. New  
427 York; 2000.
- 428 20. Thompson CC, Chimetto L, Edwards RA, Swings J, Stackebrandt E, Thompson FL.  
429 Microbial genomic taxonomy. Vol. 14, BMC genomics. 2013. p. 913.
- 430 21. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. Genome sequence-based species  
431 delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics.  
432 2013 Feb; 14:60.
- 433 22. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-  
434 DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J  
435 Syst Evol Microbiol. 2007 Jan;57(Pt 1):81–91.
- 436 23. Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT. Bypassing Cultivation To Identify Bacterial Species  
437 Identify Bacterial Species. Microbe. 2014;9(3):111–8.
- 438 24. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-  
439 of-the-art genome-based taxonomy. Nat Commun. 2019 May;10(1):2182.
- 440 25. Atasayar E, Zimmermann O, Spröer C, Schumann P, Groß U. *Corynebacterium*  
441 gottingense sp. nov., isolated from a clinical patient. Int J Syst Evol Microbiol. 2017  
442 Nov;67(11):4494–9.
- 443 26. Diop K, Nguyen TT, Delerce J, Armstrong N, Raoult D, Bretelle F, et al.  
444 *Corynebacterium* fournierii sp. nov., isolated from the female genital tract of a patient with  
445 bacterial vaginosis. Antonie Van Leeuwenhoek. 2018 Jul;111(7):1165–74.
- 446 27. Badell E, Hennart M, Rodrigues C, Passet V, Dazas M, Panunzi L, et al. *Corynebacterium*  
447 rouxii sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. Res Microbiol.  
448 2020;171(3–4):122–7.

- 449 28. Dazas M, Badell E, Carmi-Leroy A, Criscuolo A, Brisse S. Taxonomic status of  
 450 *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp.  
 451 nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2018 Dec;68(12):3826–31.
- 452 29. Jaén-Luchoro D, Gonzales-Siles L, Karlsson R, Svensson-Stadler L, Molin K, Cardew S,  
 453 et al. *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and environmental associated  
 454 *Corynebacterium*. Syst Appl Microbiol. 2020 Jan;43(1):126039.
- 455 30. McMullen AR, Anderson N, Wallace MA, Shupe A, Burnham CD. When Good Bugs Go  
 456 Bad: Epidemiology and Antimicrobial Resistance Profiles of Pathogen. Antimicrob Agents  
 457 Chemother. 2017;61(11):1–10.
- 458 31. Salem N, Salem L, Saber S, Ismail G, H Bluth M. *Corynebacterium urealyticum*: A  
 459 comprehensive review of an understated organism. Infect Drug Resist. 2015; 8:129–45.
- 460 32. Rocha DJP, Azevedo V, Brenig B, Silva A, Blom J, Ramos RT, et al. Whole-genome  
 461 sequencing reveals misidentification of a multidrug-resistant urine clinical isolate as  
 462 *Corynebacterium urealyticum*. J Glob Antimicrob Resist. 2020; 23:16–9.
- 463 33. Adderson EE, Boudreaux JW, Cummings JR, Pounds S, Wilson DA, Procop GW, et al.  
 464 Identification of clinical coryneform bacterial isolates: Comparison of biochemical methods  
 465 and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. J Clin Microbiol. 2008;46(3):921–7.
- 466 34. Rychert J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the  
 467 Identification of Microorganisms. J Infect. 2019;2(4):1–5.
- 468 35. Alatoom AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, Ihde SM, Patel R. Identification of non-  
 469 diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of  
 470 flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012 Jan;50(1):160–3.
- 471 36. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser  
 472 desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene

sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):693–6.

37. Stackebrandt E, Jonas E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol Today [Internet]. 2006; 33:152–5.

38. Khamis A, Raoult D, La Scola B. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. J Clin Microbiol. 2004 Sep;42(9):3925–31.

## Figure Legends

**Figure 1.** Phylogenetic tree showing position of the *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. against the most closely related type strains of *Corynebacterium* genus based on 16S rRNA gene sequences. GenBank accession numbers of 16S rRNA are indicated in parentheses. Alignment was performed with sequences (1430-1529 bp) of the 16S rRNA gene. The sequences were aligned using CLUSTALX2 with standard parameters; the phylogenetic inference was obtained using the Maximum Likelihood method and the MEGA X software. The inferred distance was calculated using the Kimura-2 parameters model. Bootstrap values (> 60%) based on 1.000 repetitions are shown. The sequence of *Acidimicrobium ferrooxidans* DSM 10331<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar 0.02 % estimated sequence divergence.

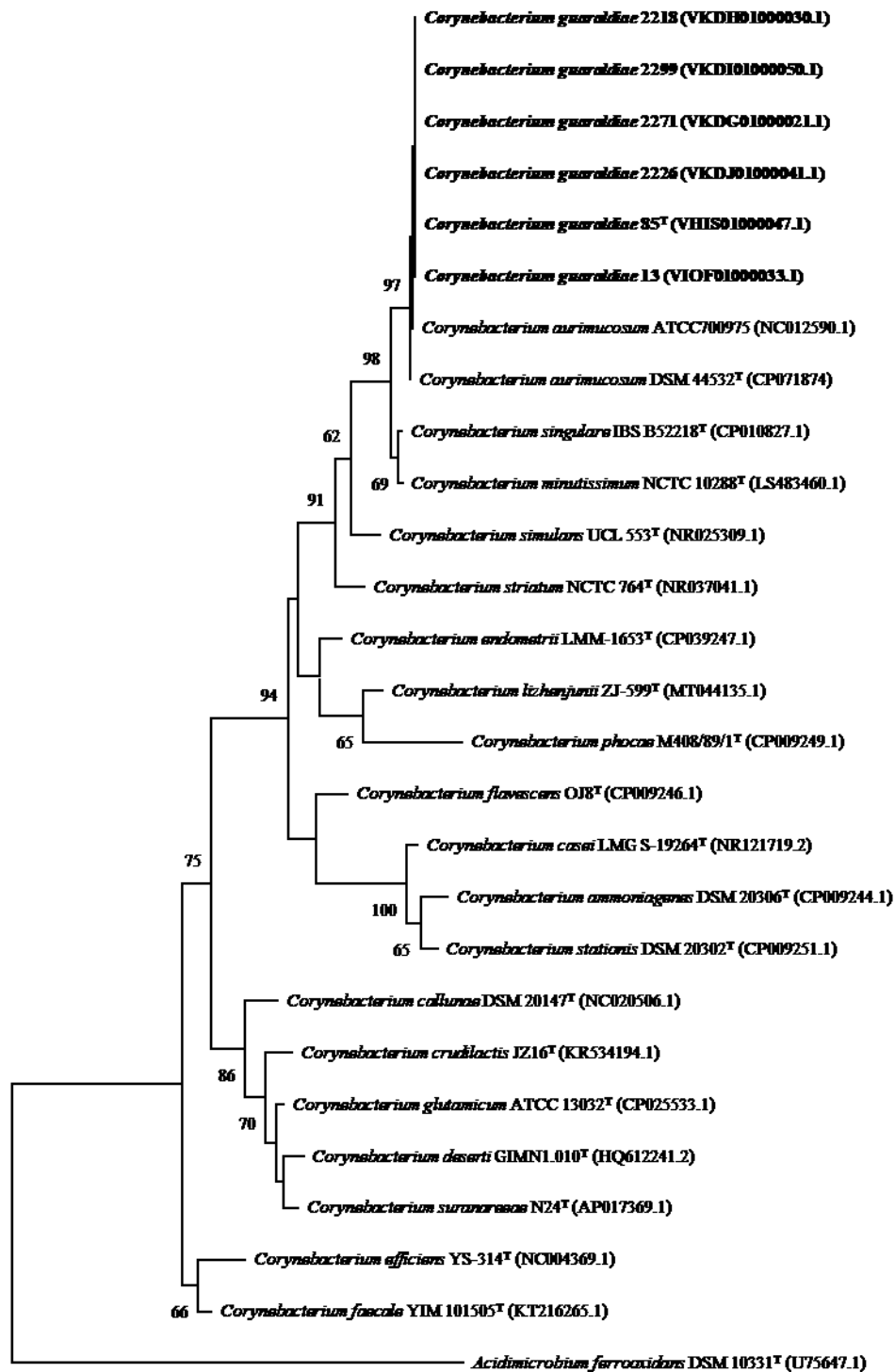
**Figure 2.** Phylogenetic tree showing the position of the *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. against to the most closely related type strains within the genus *Corynebacterium* based on *rpoB* gene sequences. GenBank accession numbers of *rpoB* are indicated in parentheses. Alignment was performed with partial sequence (419 bp) of the *rpoB* gene. The sequences were aligned using CLUSTALX2 with standard parameters; the phylogenetic inference was obtained using the Maximum Likelihood method and the MEGA X software. The inferred

distance was calculated using the Kimura-2 parameters model. Bootstrap values (> 60%) based on 1.000 repetitions are shown. The sequence of *Actinopolyspora halophila* DSM 43834<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar 0.10 % estimated sequence divergence.

**Figure 3.** Phylogenetic tree based on the MLSA approach showing the position of *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. against the most closely related strains within the genus *Corynebacterium* based on the sequences of seven housekeeping genes (*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* and *rpoB*). The GenBank access numbers for the respective genomes are indicated in parentheses. The sequences were aligned using CLUSTALX2 with standard parameters; the evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and the MEGA X software. The inferred distance was calculated using the Kimura-2 parameter model. Bootstrap values (> 60 %) are shown based on 1,000 repetitions. The strain type *Actinopolyspora halophila* DSM 43834<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar 0.10 % estimated sequence divergence.

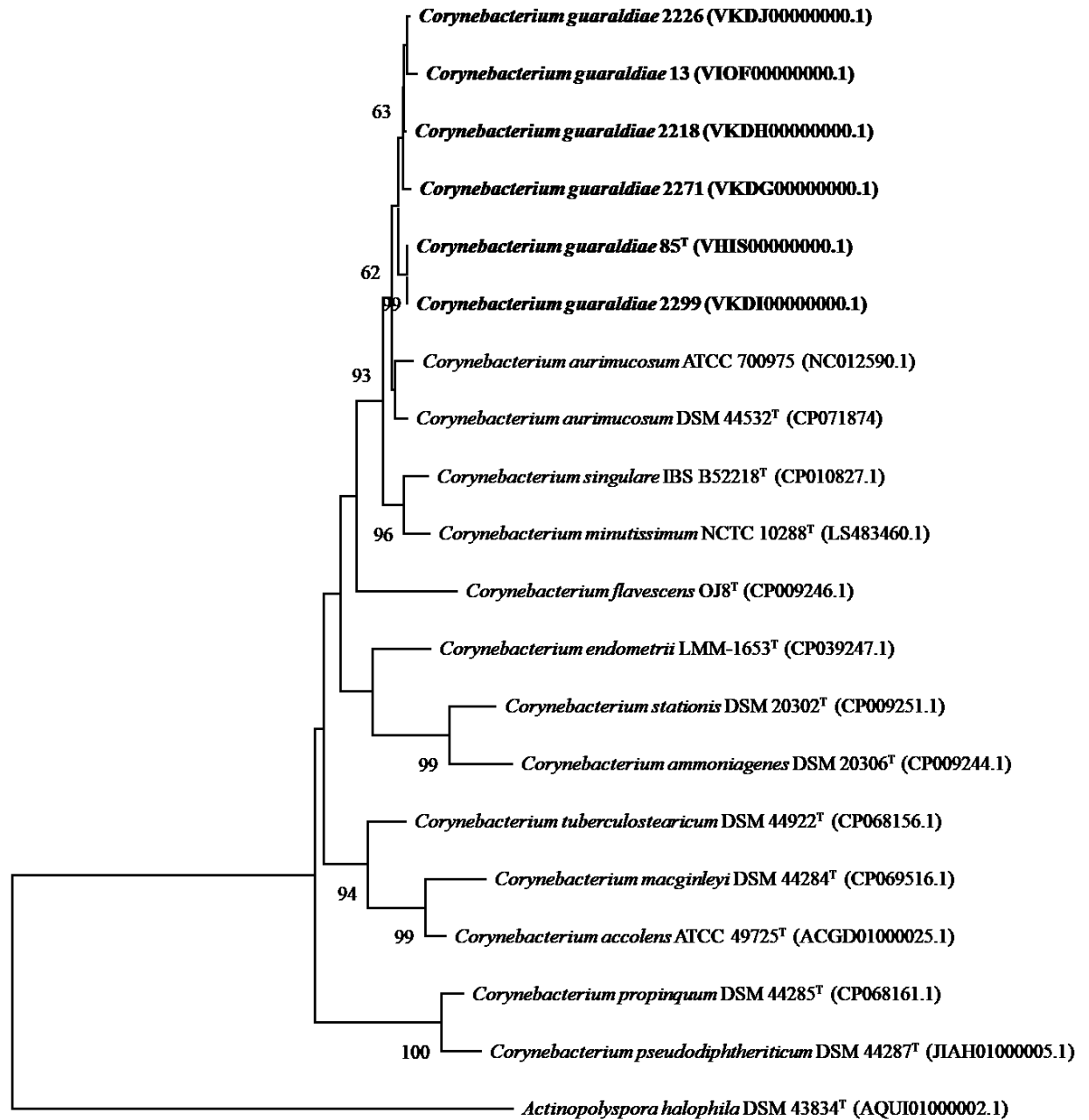
**Figure 4.** Phylotaxonomic genome tree showing the position of the *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. against to the most closely related type strains within the genus *Corynebacterium* based on whole genome sequences. The genomic sequences were analyzed by Type (Strain) Genome Server (TYGS) with standard parameters. Tree inferred with FastME 2.1.6.1 from GBDP distances calculated from genome sequences. The branch lengths are scaled in terms of GBDP distance formula d5. The numbers above branches are GBDP pseudo-bootstrap support values (> 60 %) from 100 replications, with an average branch support of 31.8 %.

Figure 1



0.02

Figure 2



**Figure 3**

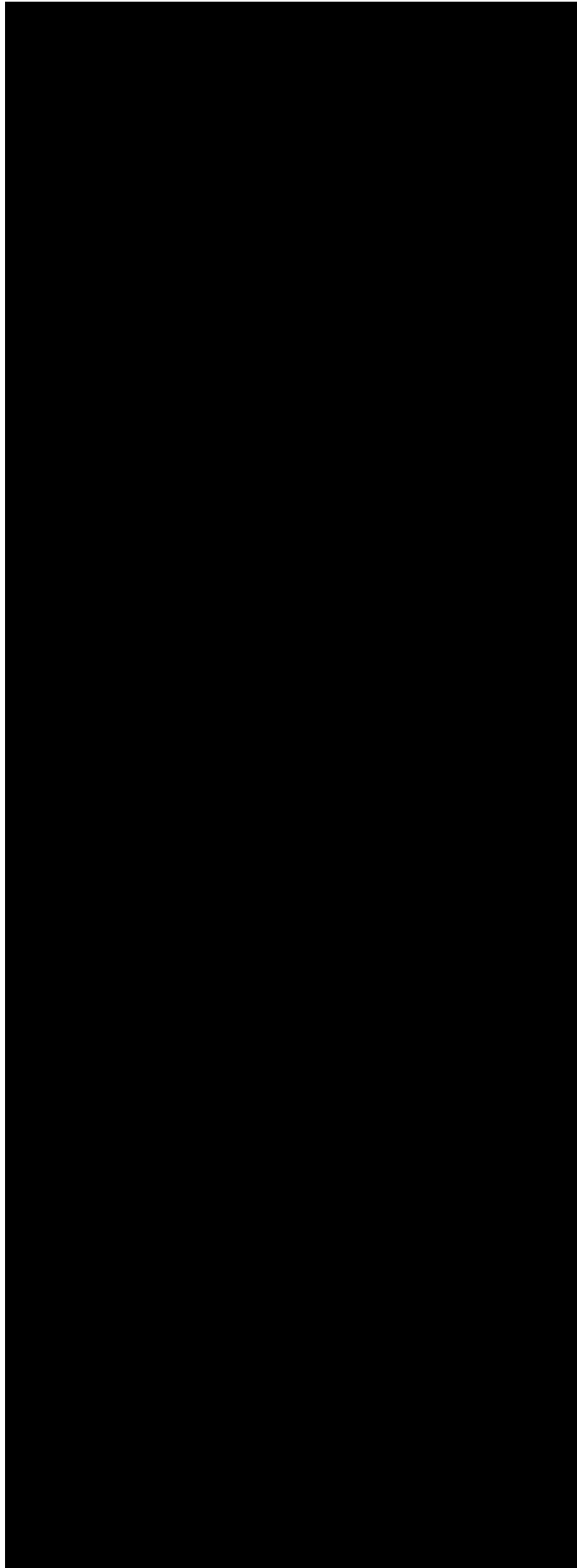
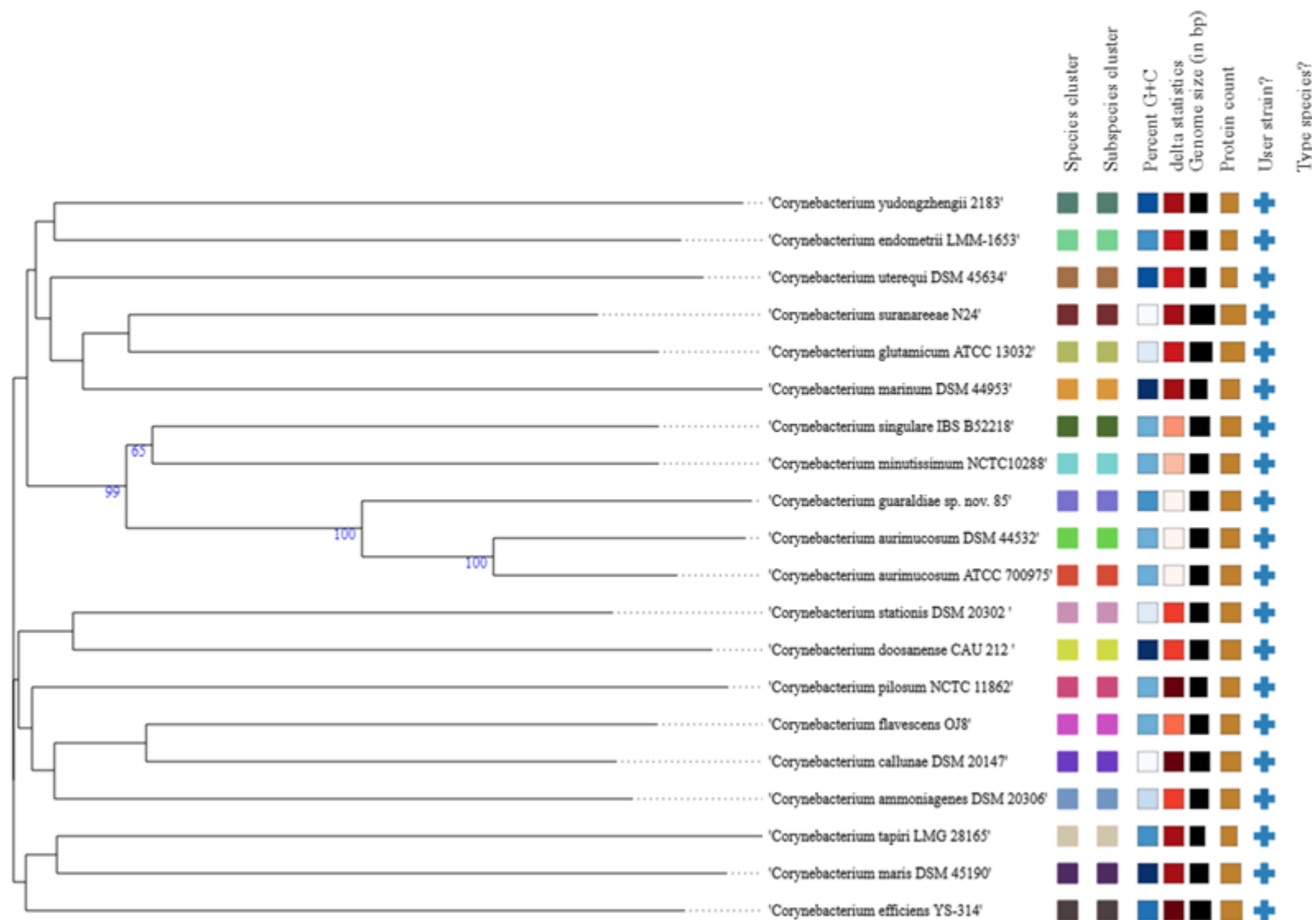


Figure 4



## Tables

**Table 1. Clinical aspects of six strains of *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. isolated from Brazil and Argentina.**

| Case/<br>strain | Date   | Clinical aspects |                   |                          | Microbiological identification |                                                               |                                                                                                                                                         |
|-----------------|--------|------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 |        | Age /<br>Gender  | Origin<br>samples | Underlying<br>conditions | Conventional                   | MALDI-TOF<br>(score <sup>*</sup> )                            | 16S rRNA <sup>a</sup> / <i>rpoB</i> <sup>b</sup> (%)                                                                                                    |
| 1/2218          | Jan/11 | 44/Female        | Urine             | Kidney<br>disease        | <i>Corynebacterium</i><br>sp.  | <i>Corynebacterium</i><br><i>aurimucosum</i><br>(1.916/1.881) | <i>C. aurimucosum</i> <sup>c</sup> (99.09/97.14)<br><i>C. singulare</i> <sup>d</sup> (98.95/94.27)<br><i>C. minutissimum</i> <sup>e</sup> (98.88/93.79) |
| 2/2226          | Fev/11 | 64/Female        | Urine             | Kidney<br>disease        | <i>Corynebacterium</i><br>sp.  | <i>C. aurimucosum</i><br>(1.734/1.714)                        | <i>C. aurimucosum</i> (99.34/96.66)<br><i>C. singulare</i> (99.04/94.27)<br><i>C. minutissimum</i> (98.97/94.27)                                        |
| 3/2271          | May/11 | NA/Female        | Urine             | Kidney<br>disease        | <i>Corynebacterium</i><br>sp.  | <i>C. aurimucosum</i><br>(2.000/1.896)                        | <i>C. aurimucosum</i> (99.45/96.42)<br><i>C. singulare</i> (99.29/94.03)<br><i>C. minutissimum</i> (99.29/93.56)                                        |
| 4/2299          | Jul/11 | 55/Female        | Urine             | Kidney<br>disease        | <i>Corynebacterium</i><br>sp.  | <i>C. aurimucosum</i><br>(1.926/1.742)                        | <i>C. aurimucosum</i> (99.11/97.14)<br><i>C. singulare</i> (98.83/94.27)<br><i>C. minutissimum</i> (98.76/93.99)                                        |
| 5/85            | May/11 | NA/Male          | Urine             | NA                       | <i>Corynebacterium</i><br>sp.  | <i>C. aurimucosum</i><br>(2.072/1.930)                        | <i>C. aurimucosum</i> (99.28/96.90)<br><i>C. singulare</i> (99.14/94.03)<br><i>C. minutissimum</i> (99.14/93.75)                                        |
| 6/13            | Mar/17 | 61/Male          | Sebaceous<br>cyst | None                     | <i>Corynebacterium</i><br>sp.  | <i>C. aurimucosum</i><br>(2.022/1.991)                        | <i>C. aurimucosum</i> (99.56/96.18)<br><i>C. singulare</i> (99.07/94.03)<br><i>C. minutissimum</i> (98.86/94.03)                                        |

<sup>a</sup> Analysis performed with partial sequence of the 16S rRNA gene of 1399-1530 bp.<sup>b</sup> Analysis performed with partial sequence of the *rpoB* gene of 419 bp.<sup>c</sup> *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>.<sup>d</sup> *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup>.<sup>e</sup> *C. minutissimum* NCTC 10288<sup>T</sup>.

NA, not available.

**Table 2. Biochemical profile by API® Coryne from Brazilian and Argentine *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. and *Corynebacterium aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> strains.**

| Biochemical characteristics | 2218                                                  | 2226                                                  | 2271                                                  | 2299                                                  | 85 <sup>T</sup>              | 13                                                    | DSM 44532 <sup>T</sup>                                |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Nitrate reductase           | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Pyrazinamidase              | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                            | +                                                     | +                                                     |
| Pyr*                        | +                                                     | -                                                     | -                                                     | +                                                     | -                            | +                                                     | -                                                     |
| Alkaline phosphatase        | +                                                     | +                                                     | -                                                     | -                                                     | +                            | +                                                     | +                                                     |
| β-gur*                      | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| β-gal*                      | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| α-glu*                      | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| β-NAG*                      | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Esculin                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Urease                      | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Gelatin hydrolise           | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Oxidase                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Glucose                     | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                            | +                                                     | +                                                     |
| Ribose                      | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | +                            | -                                                     | -                                                     |
| Xylose                      | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Mannitol                    | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | +                            | -                                                     | -                                                     |
| Maltose                     | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                            | +                                                     | +                                                     |
| Lactose                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Sucrose                     | +                                                     | +                                                     | -                                                     | +                                                     | +                            | -                                                     | +                                                     |
| Glycogen                    | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                                                     | -                            | -                                                     | -                                                     |
| Catalase                    | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                                                     | +                            | +                                                     | +                                                     |
| Result                      | <i>C. striatum</i><br><i>C. amycolatum</i><br>(86.3%) | <i>C. striatum</i><br><i>C. amycolatum</i><br>(96.0%) | <i>C. striatum</i><br><i>C. amycolatum</i><br>(50.9%) | <i>C. striatum</i><br><i>C. amycolatum</i><br>(85.1%) | <i>C. group G</i><br>(80.6%) | <i>C. striatum</i><br><i>C. amycolatum</i><br>(67.8%) | <i>C. striatum</i><br><i>C. amycolatum</i><br>(96.0%) |

\*Pyr: pyrrolindonilarilamidase; β-gur: β-glucuronidase; β-gal: β-galactosidase; α-glu: α-glucosidase; β-NAG: β-glucosaminidase.

**Table 3. Comparison values of *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. strains sequenced, assembled, and annotated with the type strain *C. aurimucosum* DSM 44532.**

| Characteristics                      | 2218      | 2226      | 2271      | 2299      | 85        | 13        |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Estimated genome size (bp)           | 2.737.922 | 2.742.396 | 2.657.049 | 2.720.157 | 2.669.544 | 2.637.059 |
| G+C content (%)                      | 60.9      | 61.1      | 61.0      | 61.1      | 61.1      | 61.1      |
| Number of contigs                    | 52        | 58        | 41        | 94        | 55        | 61        |
| Median sequence size (bp)            | 11630     | 14759     | 1531      | 7509      | 25466     | 9004      |
| N50                                  | 167.477   | 155.949   | 192.309   | 84.611    | 111.082   | 155.575   |
| L50                                  | 7         | 7         | 5         | 12        | 8         | 7         |
| Number of CDSs                       | 2796      | 2766      | 2640      | 2728      | 2597      | 2559      |
| Number of RNA genes                  | 60        | 59        | 58        | 59        | 58        | 58        |
| Proteins with functional assignments | 1685      | 1689      | 1650      | 1717      | 1633      | 1612      |
| Hypothetical proteins                | 1111      | 1077      | 990       | 1011      | 964       | 947       |

bp, base pair; CDS, Coding sequence; RNA, Ribonucleic acid;

**Table 4. Genomic taxonomy results of *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. isolates compared to three closely related taxa, *Corynebacterium aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>, *Corynebacterium minutissimum* NCTC 10288<sup>T</sup>, *Corynebacterium singulare* IBS B55218<sup>T</sup>, and the reference strain of *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975.**

| Strains         | DSM 44532 <sup>T</sup> |                  |                   | NCTC 10288 <sup>T</sup> |       |       | IBS B55218 <sup>T</sup> |       |       | ATCC 700975 |       |       |
|-----------------|------------------------|------------------|-------------------|-------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-------------|-------|-------|
|                 | ANI <sup>a</sup>       | AAI <sup>b</sup> | GGDC <sup>c</sup> | ANI                     | AAI   | GGDC  | ANI                     | AAI   | GGDC  | ANI         | AAI   | GGDC  |
| 2218            | 87.59                  | 91.68            | 34.50             | 83.74                   | 87.30 | 25.10 | 83.64                   | 86.63 | 24.90 | 88.36       | 91.98 | 36.00 |
| 2226            | 87.70                  | 91.41            | 34.70             | 84.00                   | 86.93 | 25.20 | 83.14                   | 86.29 | 24.60 | 88.46       | 92.18 | 36.40 |
| 2271            | 87.57                  | 92.13            | 34.40             | 83.78                   | 87.21 | 25.10 | 83.28                   | 86.55 | 24.50 | 88.26       | 92.48 | 35.90 |
| 2299            | 87.69                  | 91.87            | 34.80             | 83.85                   | 87.21 | 25.10 | 83.19                   | 86.49 | 24.70 | 88.22       | 92.60 | 36.30 |
| 85 <sup>T</sup> | 87.58                  | 92.19            | 34.40             | 83.88                   | 87.30 | 25.00 | 83.42                   | 86.37 | 24.60 | 88.25       | 92.67 | 36.00 |
| 13              | 87.55                  | 92.07            | 34.60             | 83.83                   | 87.49 | 25.00 | 83.16                   | 86.38 | 24.50 | 88.30       | 92.48 | 36.00 |

<sup>a</sup>Average Nucleotide Identity.

<sup>b</sup>Average Amino acid Identity.

<sup>c</sup>Genome to Genome Distance Calculator.

**3.2 Artigo 2: *Corynebacterium hiratae* sp. nov. isolada de urina humana e proposta do nome revivido de *Corynebacterium nigricans* Shukla *et al.*, 2003 pro synon. *Corynebacterium aurimucosum* para *Corynebacterium nigricans* (ex. Shukla *et al.*, 2003) nom. rev.**

INTRODUÇÃO: *Corynebacterium* spp. estão amplamente disseminadas no meio ambiente e fazem parte da microbiota cutânea e de mucosas de animais e humanos. Relatos de infecções em humanos por *Corynebacterium* spp. aumentaram consideravelmente nos últimos anos e o aparecimento de isolados MDR em todo o mundo tem chamado a atenção.

OBJETIVOS: Neste estudo, uma nova espécie de *Corynebacterium* isolada da urina humana é descrita após ser identificada incorretamente usando os métodos disponíveis, e também propomos o reavivamento do nome da cepa atualmente chamada de *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, tornando-se *Corynebacterium nigricans* (ex. Shukla *et al.*, 2003) *nom. rev.*, com CN-1<sup>T</sup> como a cepa tipo.

MÉTODOS: Para as análises taxonômicas, foram utilizadas análises filogenéticas dos genes 16S rRNA e *rpoB*, hibridização DNA-DNA digital, identidade média de nucleotídeos e aminoácidos, análise da sequência de múltiplos *loci* e análise filogenética baseada no genoma completo.

RESULTADOS: As análises taxonômicas genômicas revelaram que as cepas de urina e ATCC 700975 eram espécies não descritas anteriormente, compondo um clado filogenético distinto dos demais *Corynebacterium* spp. ao contrário do que indicavam as análises de similaridade.

PRINCIPAIS CONCLUSÕES: Propomos o nome *Corynebacterium hiratae* sp. nov. com o isolado 2274<sup>T</sup> como cepa tipo e a aplicação da regra taxonômica 33c para reviver o nome *Corynebacterium nigricans* para a cepa ATCC 700975.

**Title page**

***Corynebacterium hiratae* sp. nov. isolated from a human urine and proposal the revived name from *Corynebacterium nigricans* Shukla et al., 2003 *pro synonym. Corynebacterium aurimucosum* for *Corynebacterium nigricans* (ex. Shukla et al., 2003) *nom. rev.***

**Lincoln de Oliveira Sant'Anna<sup>1\*</sup>, Louisy Sanches dos Santos<sup>1</sup>, Max Roberto Batista Araújo<sup>2</sup>, Juliana Nunes Ramos<sup>1,3</sup>, Paulo Victor Pereira Baio<sup>4</sup>, Pedro Guimarães Coscarelli<sup>5</sup>, Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Hermes Pardini Institute, Vespasiano, Brazil.

<sup>3</sup>Interdisciplinary Laboratory of Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>Army Chemical and Pharmaceutical Laboratory, Ministry of Defense, Brasília, Brazil.

<sup>5</sup>University Hospital Pedro Ernesto, Health Surveillance Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

**\*Corresponding author:**

Lincoln O. Sant'Anna

[lincolnsantanna.microuerj@gmail.com](mailto:lincolnsantanna.microuerj@gmail.com)

## Abstract

**BACKGROUND:** *Corynebacterium* spp. are widely disseminated in the environment, and they are part of the skin and mucosal microbiota of animals and humans. Reports of human infections by *Corynebacterium* spp. have increased considerably in recent years and the appearance of multidrug resistant isolates around the world has drawn attention.

**OBJECTIVES:** In this study, a new species of *Corynebacterium* from human urine is described after being misidentified using available methods, and we propose revival the name of the strain currently called *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, becoming *Corynebacterium nigricans* (ex Shukla et al., 2003) nom. rev., with CN-1T as the type strain.

**METHODS:** For taxonomic analyses, phylogenetic analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes, in silico DNA-DNA hybridization, average nucleotide and amino acid identity, multilocus sequence analysis, and phylogenetic analysis based on the complete genome were used.

**FINDINGS:** Genomic taxonomic analyzes revealed that the urine and the ATCC 700975 strains were species not previously described, composing a phylogenetic clade distinct from the other *Corynebacterium* spp. contrary to what the similarity analyzes indicated.

**MAIN CONCLUSIONS:** We propose the name *Corynebacterium hiratae* sp. nov. with 2274T isolate as the type strain, and the application of taxonomic rule 33c to revive the name *Corynebacterium nigricans* for the strain ATCC 700975.

**Keywords:** *Corynebacterium*; *Corynebacterium hiratae* sp. nov.; urinary tract infection; classification; genomic taxonomy.

## Introduction

*Corynebacterium* genus was created to harbor the diphtheria bacillus, *Corynebacterium diphtheriae*, and currently comprises 133 species of gram-positive, non-spore-forming, catalase-positive bacilli that contain a high G+C content. The *Corynebacterium* spp. are widely disseminated in the environment, and they are part of the skin and mucosa microbiota of animals and humans. It is the largest genus among coryneform with a medical, biotechnological, and veterinary interest (FUNKE, GUIDO *et al.*, 1997; PARTE *et al.*, 2020).

For some years, professionals have valued *Corynebacterium* spp. and no longer considered them as mere contaminants, not only because of the significant increase in cases reporting infections by these microorganisms but also because of the increase in the resistance profiles of these isolates (BARRACLOUGH *et al.*, 2009; BLÄCKBERG *et al.*, 2021; FUNKE, GUIDO *et al.*, 1997). In recent years, an increase of multidrug-resistant (MDR) isolates of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium jeikeium* and another *Corynebacterium* spp. have been found worldwide (BAIO *et al.*, 2013; HENNART *et al.*, 2020; MOORE PARDO *et al.*, 2020; SALEM *et al.*, 2015; SÁNCHEZ HERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

Species-level identification for *Corynebacterium* spp. is recommended since many species are of medical importance, including *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium rouxii* and *Corynebacterium silvaticum*, all of which can carry the *tox* gene, encoding diphtheria toxin (DT) (ALATOOM *et al.*, 2012; BERNARD, KATHRYN A *et al.*, 2021; FUNKE, GUIDO *et al.*, 1997). However, given the wide variety of species and the close relationship between them, identification has become a challenge, since it involves a variety

of biochemical tests and is not always included in the commercial systems available (ALIBI, S. *et al.*, 2015).

The use of molecular methodologies has been recommended for the identification of *Corynebacterium* spp. In this sense, 16S rRNA gene sequencing is widely used considering the almost complete sequence ( $\approx 1500$  bp) of this gene to make a more precise distinction, due to the low polymorphism of this gene. In the impossibility of identification at the species level by 16S rRNA gene sequence analysis, the sequencing of the *rpob* gene can be analyzed (BARBERIS, CLAUDIA *et al.*, 2014; KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004). However, gene sequence analysis has not been routinely implemented in the clinical laboratory (BARBERIS, CLAUDIA *et al.*, 2014).

Recently, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) has become a promising tool for microorganism identification and this technique has limitations regarding closely related species and the updating of the library database (BARBERIS, CLAUDIA *et al.*, 2014; RYCHERT, 2019).

The bacterial identification limitations have always been an important point concerning closely related species, including a disadvantage of applying polyphasic taxonomy (VARGHESE *et al.*, 2015). However, since the 2010s, full genome-based analyzes of prokaryotic microorganisms have been used to help differentiate microbial species. Called genomic taxonomy, the approach relies on genomic signatures contained in the genome to carry out phylogenetic relationships through programs that use tools based on dependent and independent alignments. The importance of using genomic comparisons to species identify has long been recognized, including by the ad hoc Committee on Bacterial Systematics, which recommends the complete DNA sequence for the phylogeny determination (HAYASHI SANT'ANNA *et al.*, 2019; WAYNE, 1988).

In the present study, we describe, based on genomic taxonomy, *Corynebacterium* isolated from human urine after being misidentified by commonly used phenotypic and molecular methodologies. The name *Corynebacterium hiratae* sp. nov. was proposed for the new species of the *Corynebacterium* genus, with 2274<sup>T</sup> (= CBAS 762<sup>T</sup>) isolate as the type strain. Genomic taxonomy analysis also proposes the application of rule 33c of the International Code of Bacterial Nomenclature and revive the name of the strain currently named *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, becoming *Corynebacterium nigricans* (ex. Shukla et al., 2003) *nom. rev.*, with strain CN-1<sup>T</sup> (= ATCC 700975<sup>T</sup>; = CCUG 48176<sup>T</sup>, = CIP 107346<sup>T</sup>, = DSM 44827<sup>T</sup>, = JCM 12684<sup>T</sup>) as the type strain.

## Materials and Methods

### Origin of bacterial isolate

A Gram-positive rod isolate was recovered from a urine sample ( $5.0 \times 10^3$  CFU/mL) of a 53-year-old renal transplant patient with post-transplant diabetes mellitus evolution at the Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance of the State University of Rio de Janeiro. The isolate was submitted to phenotypic identification by the API® Coryne commercial system (bioMérieux, France), according to the manufacturer's guidelines, using APIWEB™ version 3.0, for an interpretation of the API strip results. At the same time, the isolate was submitted to MALDI-TOF-MS (Microflex®, Bruker Daltonics, France), following the protocol previously described (THEEL *et al.*, 2012), using the analysis software Maldi Flex Control and Maldi Biotyper, both version 3.0, to interpret the results.

## **Genotypic identification by 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing and phylogenetic analysis**

The 16S rRNA and *rpoB* genes amplification were performed according with protocols previously described (BAIO *et al.*, 2013). The 16S rRNA gene sequence was compared with the respective available and valid gene sequences to type strains on the EzBioCloud server (<https://www.ezbiocloud.net>) using the 16S-basedID application (YOON, SEOK-HWAN *et al.*, 2017). The *rpoB* gene sequence was compared to type strains sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Both gene sequences were separately aligned together with type strain sequences of the most related species by ClustalX2 (THOMPSON, J D *et al.*, 1997) and the phylogenetic analyzes of each gene were performed using the MEGA X program (version 10.2.6) (KUMAR *et al.*, 2018).

## **Genome sequencing, assembly, and annotation**

Genome sequencing was performed by Ion Torrent S5 platform, using Ion 540™ Chip to 200 bp libraries (ThermoFisher Scientific) at Department of Biotechnology of Institute of Health Sciences at Federal University of Bahia. The gDNA libraries were prepared according to manufacturer's protocol for enzymatic fragmentation (50 ng to 100 ng) of DNA, using Ion Xpress™ Plus Fragment Library kit. To distinguish samples, Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit was applied. To select the proper fragmented size, the EGel™ SizeSelect™ Agarose Gel was used, following stain migration, in real time, with a 2% agarose gel for the time suggested in the manufacturer's protocol. The isolate purification steps were made through ProNex® Size-Selective Purification System kit (Promega) at the ratio 2:1 of magnetic beads. To library equalization, Ion Library Equalizer™ Kit was applied. Template preparation to

sequencing followed strictly the protocol for Ion 540™ Kit – OT2, Ion 540™ Chip, Ion OneTouch™ and Ion OneTouch™ ES instruments. The mass value for DNA, when needed, were obtained by Qubit®. The raw sequenced data obtained from isolate were collected again using SPAdes (version: 3.10.0) and annotation was performed using Rapid Annotation using System Technology (RAST) (AZIZ *et al.*, 2008).

### **Multilocus sequence analysis**

For Multilocus Sequence Analysis (MLSA) complete sequences of seven housekeeping genes: alpha chain of ATP synthase (*atpA*), alpha subunit of DNA polymerase III (*dnaE*), chaperone protein (*dnaK*), elongation factor G (*fusA*), 2-isopropylmalate synthase (*leuA*), 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 and E2 (*odhA*) components and DNA-directed RNA polymerase beta chain (*rpoB*) were extracted from the complete sequenced genome of the isolate. The sequences of the seven housekeeping genes of type strains of the closest species were retrieved from draft/complete genome sequences available in GenBank/NCBI. All these genes were separately aligned by CLUSTALX2 and later concatenated (*atpA-dnaE-dnaK-fusA-leuA-odhA-rpoB*) and exported in FASTA format, providing a dataset of 15 strains and 16,427 nucleotides in the final dataset. Phylogenetic analysis was reconstructed with the maximum likelihood method by Kimura 2 parameter models (KIMURA, M, 1980).

### **Genomic taxonomy**

Complete genome sequences of the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain (CP071874), and *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain (formerly *Corynebacterium nigricans*; NC012590.0.1) available in the public repository GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) were used for the comparative taxonomic analyzes of this study. The degree of genomic similarity of the species was estimated through in-silico

DNA-DNA hybridization (DDH) determined in-silico by the Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) version 3.0 (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>) (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013); the Average Nucleotide Identity (ANI) / Average Amino acid Identity (AAI) by the Environmental Microbial Genomics Laboratory online platform based on the ANI Calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) and AAI Calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/tools>) (GORIS *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014); and the analysis of the complete genome-based supertree by the Type Strain Genome server (<https://tygs.dsmz.de>) (TYGS) version 3.0 (MEIER-KOLTHOFF; GÖKER, 2019), as previously described (THOMPSON, CRISTIANE C *et al.*, 2013).

## Accession numbers

Accession numbers of whole genome shotgun sequence of isolates 2274 was deposited at GenBank under the accession VKDK000000000.

## Results and Discussion

*C. diphtheriae* is the most relevant pathogen of the *Corynebacterium* genus, a potentially DT-producing species, together with *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. belfantii*, *C. rouxii*, and *C. silvaticum*. These last three species were recently classified using tools based on genomic analysis from the species *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* (BADELL *et al.*, 2020; BERNARD, KATHRYN, 2012; BERNARD, KATHRYN A *et al.*, 2021; DANGEL *et al.*, 2020; DAZAS *et al.*, 2018).

*Corynebacterium* non-diphtheriae, not potentially DT-producing, over the last few years has shown its pathogenic potential through reports involving several infections in prime sites and fatal in some cases, becoming increasingly recognized as an etiological agent for

different infections (AYGUN *et al.*, 2013; MOORE PARDO *et al.*, 2020). Considering the *Corynebacterium* spp. importance, the identification although challenging at the species level should be performed whenever they grow in pure culture from clinical specimens or when represent the predominant organisms in normally sterile samples (BERNARD, KATHRYN, 2012; BLÄCKBERG *et al.*, 2021).

The phenotypic identification of the isolate *Corynebacterium* sp. 2274 (this study) using the API® Coryne system was inconclusive, characterizing the isolate as *Corynebacterium* group G, a group of samples described by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) as capable of fermenting glucose, sucrose, and sometimes maltose, but absent of urease production (Table 1). *Corynebacterium* group G is a group subdivided into G-1 and G-2 and can be differentiated by the production of nitrate reductase, which is present in isolates from group G-1, but not from group G-2. Thus, the isolate *Corynebacterium* sp. 2274, would then be identified as *Corynebacterium* group G-2 in according to results of the API® Coryne system complemented by the study by Funke and collaborators (FUNKE, GUIDO *et al.*, 1997). For a better understanding, we will respect the consensus recommended by the CDC to designate the isolates from these groups as *Corynebacterium* group G (FUNKE, GUIDO *et al.*, 1997). In further studies, it was already observed that the phenotypic identification of *Corynebacterium* spp. by commercial systems do not always obtain an accurate result, because the identification grid that these systems include do not cover enough species (ADDERSON; BOUDREAUX; HAYDEN, 2008).

The identification of the isolate obtained by the MALDI-TOF-MS system concluded that the isolate belonged to *C. aurimucosum* species with a confidence score (2.025), considered a reliable identification at the genus level and probable at species level identification, according to the manufacturer's guidelines. Previous studies correlating the *Corynebacterium* spp. identification by the MALDI-TOF-MS system and the identification

through the 16S rRNA gene sequencing obtained satisfactory results, indicating that the MALDI-TOF-MS system identification is a reliable, fast, and it have low-cost (ALATOOM *et al.*, 2012; ALIBI, S. *et al.*, 2015). The Table 2 shows the results of isolate *Corynebacterium* sp. 2274 identification by the different methods. However, in several methodologies, due to the close relationship between *C. aurimucosum* and *Corynebacterium minutissimum*, *C. aurimucosum* was wrongly identified by these tools. The MALDI-TOF-MS and API® Coryne systems did not obtain a reliable identification for the isolate *Corynebacterium* sp. 2274 as expected, considering the value of its score and the results of the phenotypic analysis, because it is a new taxon not previously described for the scientific community.

The 16S rRNA gene sequencing has been used for identifying bacteria that are difficult to differentiate. For *Corynebacterium* spp., only this technique is not considered enough, since some related species obtain similarities among themselves that reach up to 99.3%, surpassing 0.6% of the cutoff point proposed for this methodology (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004). Other species within the *Corynebacterium* genus also have a high similarity for the 16S rRNA values (ALATOOM *et al.*, 2012; KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004). To solve this problem, Khamis and collaborators (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004) observed that the *rpoB* gene had a larger polymorphism than the 16S rRNA gene and by constructing universal primers for the *rpoB* gene based on a highly polymorphic region they concluded that for the species described until that moment, the analysis based on this methodology was sufficient to identify all *Corynebacterium* spp. and they had as cutoff proposed values equal to or above 95% of similarity. By sequencing both genes, *Corynebacterium* sp. 2274 was identified as *Corynebacterium aurimucosum* with similarity values above the proposed cutoff points (Table 1). However, we must consider that at the time of the study by Khamis and collaborators (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004), the

genus *Corynebacterium* included around 60 species, and currently, up to the time of this writing, the genus includes 133 valid species (PARTE *et al.*, 2020).

Recently, with the species classification of the diphtheria complex that was previously known to include the species *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, and *C. pseudotuberculosis*, today they harbor three more species, *Corynebacterium belfantii*, classified from isolates previously identified as *C. diphtheriae*, *Corynebacterium rouxii*, classified from isolates previously identified as *C. belfantii* and *C. silvaticum*, classified from isolates previously identified as *C. ulcerans* (BADELL *et al.*, 2020; DANGEL *et al.*, 2020; DAZAS *et al.*, 2018). Importantly, recent taxonomic classifications and reclassifications are mainly due to bioinformatics analysis based on data from the complete genome sequencing that has recently been widely used to solve problems inherent to the bacterial classification (CHUN; RAINEY, 2014). These recent studies lead us to believe that the observations made by Khamis and collaborators (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004) for the 16S rRNA gene about some more related species can also be observed for the *rpoB* gene, a fact not mentioned by Khamis and collaborators (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004) facing the reality of species that the *Corynebacterium* genus included. These new findings suggest that a study covering the currently described of *Corynebacterium* species is necessary for a better application of the *rpoB* gene sequencing technique, which, as observed in our study it obtained a similarity between the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate and *C. aurimucosum* 97.85%, a percentage 2.85% above the proposed cutoff point for the species differentiation.

Interestingly, the results of the phylogenetic analysis from 16S rRNA gene of the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate against the type strains of the most related species and the *C. aurimucosum* ATCC 70975 reference strain revealed that the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate is closer to the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain than to the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain. The *Corynebacterium* sp. 2274 isolate groups together

with the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain in a clade distinct from the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain (Figure 1). Although the *Corynebacterium* sp. isolate occupies a position in the same clade as the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain, there is a small phylogenetic distance between them, as can be seen in Figure 1. Regarding the phylogenetic analysis of the partial sequence of the *rpoB* gene, we observed the opposite of the phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene. The *Corynebacterium* sp. isolate occupies a phylogenetic position close to the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain, in the same clade, with a small phylogenetic distance (Figure 2).

The *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain, until then identified as *C. nigricans*, was reclassified by Daneshvar and collaborators (DANESHVAR *et al.*, 2004) based on DNA-DNA hybridization performed according to the gold standard technique for taxonomic classification. At the time of the study carried out by Daneshvar and collaborators (DANESHVAR *et al.*, 2004), the hybridization between *C. aurimucosum* NRRL B-24143 (= DSM 44532) type strain and *C. nigricans* ATCC 700975 obtained was 97% at optimum temperature (60°C). In view of these results, and obeying the taxonomic rules, the *C. nigricans* ATCC 700975 strain was proposed as a synonym (pro synon.) of *C. aurimucosum*, thus ceasing to be the *C. nigricans* type strain and becoming *C. aurimucosum*. However, even though such results show DDH values that are understood to belong to the same bacterial species, in our analyses, carried out based on the complete genome available in GenBank, and using the application of genomic taxonomy, as will be seen below, we found results opposite to those found previously (DANESHVAR *et al.*, 2004).

Digital DDH, although it has disadvantages such as being extremely labor intensive, requiring qualified personnel to carry it out, and expensive, is considered within the scope of prokaryote taxonomy, the gold standard, however, presents a rough indirect paired comparison between genomes and not necessarily showing a correspondence between the

analyzed genomes, since different values can be obtained when analyzed inversely (SCHLEIFER, 2009). In this sense, the analyzes proposed by genomic taxonomy offer greater security when used and its metrics are being increasingly recommended, such as the in-silico DNA-DNA hybridization technique, which, in addition to being correlated with the gold standard technique, can be reproduced anywhere obtaining the same intergenomic relationship, thus eliminating one of the disadvantages of the gold standard technique (HAYASHI SANT'ANNA *et al.*, 2019). The analysis of the hypotheses about the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain continue to be shown in parallel with the study of the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate of this study.

The results generated through the phylogenetic analysis of the concatenation of the seven housekeeping genes of the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate, the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain, the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain, and the more related species, through the MLSA revealed a different position from those obtained by the phylogenetic analysis of the 16S rRNA and *rpoB* genes (Figure 3). The *Corynebacterium* sp. 2274 isolate was positioned separately from the clade that grouped the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain and the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain. It is noted that even though grouped in the same clade, it is possible to observe that there is a phylogenetic distance between them, so that the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate is more related to the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain, corroborating the result obtained by the phylogeny of the complete 16S rRNA gene. It is important to consider that although the evolution of housekeeping genes compared to the 16S rRNA gene is faster, the housekeeping genes are still considered ideal for phylogenetic studies, and it is even recommended that at least five genes be used in MLSA analysis, once it has already been observed that a lower number than this is already possible to differentiate between closely related species (Sant'Anna *et al.*, 2019). In our study, the number of genes chosen to perform

this analysis was seven, the same number used in most phylogenetic studies based on this methodology (HAYASHI SANT'ANNA *et al.*, 2019).

The average size of *Corynebacterium* sp. 2274 genome sequencing was 2.87 Mb with 61.1% of G + C content. The sequencing process rendered 16.784.287 reads with a coverage of 1068 X. The assembly produced 85 contigs with a total of 2.865.662 bp, N50 of 85.002 bp, and the longest contig is 276.321 bp. General features of genome sequencing of the *Corynebacterium* sp. 2274, *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain, and the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain provided by RAST were shown in Table 3.

The *in silico* DDH values obtained by the analysis using the GGDC software of the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate when compared with the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain and the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain were 38.0% and 36.1%, respectively. When we compared the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain and the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain, we obtained 50.3% of in-silico DDH. Both analyzes obtained values below the established cutoff point to be considered as belonging to the same species ( $\geq 70\%$ ), indicating that both strains analyzed against *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain are distinct species (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013).

Similarly, the ANI and AAI analysis of the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate when compared with the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain and the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain resulted in 89.20% and 88.47% (ANI), and 92.27% and 92.02% (AAI), respectively, while the results of the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain against the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain, obtained for ANI and AAI were 92.53% and 95.29%, respectively. Except for the AAI result corresponding to the analysis of the *C. aurimucosum* ATCC 700975 reference strain and the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain, all other results are below the cutoff point established to consider as belonging to the same species ( $\geq 95\%$ ). The values found below the cut-off point corroborated the initial

proposal for ANI and AAI analysis, which are correlated to 70% in-silico DDH (GORIS *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2014). So far, we are not able to explain the AAI value obtained between the samples *C. aurimucosum* ATCC 700975 and *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>.

Complete genome-based phylogenetic tree built on the TYGS server provided evidence for the distinct taxonomic position of the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate within the *Corynebacterium* genus as shown in Figure 4. This analysis corroborates the results obtained so far by the MLSA analysis, in which it is possible to observe the formation of a distinct clade from the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate compared to other species, such as those observed in this phylogenetic tree, and by genomic taxonomy analysis, which distinguishes the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate of the most related species, *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>. It can also be observed that the *C. aurimucosum* ATCC 700975 strain, in the same way as the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate is positioned in a clade distinct from the *C. aurimucosum* DSM 44532 type strain, grouping with what was previously known as *C. nigricans* ATCC 700975<sup>T</sup>, now *C. nigricans* pro synonym. *C. aurimucosum* ATCC 700975 (identical strain).

Finally, after considering all the results discussed above, the *Corynebacterium* sp. 2274 isolate analyzed in this study and the *C. aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans*) reference strain, we conclude that they are distinct species from the most related species, *C. aurimucosum* DSM 44532. We propose the name *Corynebacterium hiratae* sp. nov., with isolate 2274<sup>T</sup> (= CBAS 762<sup>T</sup>) as the type strain and we also propose the application of rule 33c of the International Code of Bacterial Nomenclature and revive the name of the strain currently named *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, becoming *Corynebacterium nigricans* (ex. Shukla *et al.*, 2003) *nom. rev.*, with strain CN-1<sup>T</sup> (= ATCC

700975<sup>T</sup>; = CCUG 48176<sup>T</sup>, = CIP 107346<sup>T</sup>, = DSM 44827<sup>T</sup>, = JCM 12684<sup>T</sup>) as the type strain.

### **Description of *Corynebacterium hiratae* sp. nov.**

*Corynebacterium hiratae* (hi.ra'.tae. N.L. gen. masc. n. hiratae, of Raphael Hirata Junior, *in memoriam*, a Brazilian scientist, dentist and professor at the State University of Rio de Janeiro, member of the Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, who has made relevant contributions to Brazilian and world science regarding diphtheria and other corynebacterial infections). The characteristics described below are based on the isolate comprised in this study.

Cells are Gram-positive, non-acid-fast, non-spore-forming, non-motile, growth in aerobic conditions (48 hours). Cream, mucoid, circular, smooth, and medium colonies (up to 2 mm in diameter) were observed after 48 hours of incubation on a 5% sheep blood agar medium, at 37°C. The isolates were found to be catalase, and pyrazinamidase positive, but nitrate, urease, esculin, oxidase and hydrolyzed gelatin were negative. Activities of  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase, and  $\beta$ -glucosaminidase were not detected. The isolate was positive for pyrrolidonyl arylamidase and alkaline phosphatase. Regarding the acid production capacity, they were observed for glucose, ribose, maltose, and sucrose, but not for lactose, mannitol, xylose, and glycogen. No pigment was observed.

The genome size of isolate 2274<sup>T</sup> (= CBAS 762<sup>T</sup>) is estimated at 2.87 Mb with 61.1 mol % of G + C content. The genome is deposited in GenBank under access number VKDK00000000. The type strain is 2274<sup>T</sup> (= CBAS 762<sup>T</sup>), isolated in 2011 from urine sample in Rio de Janeiro, Brazil.

### 395 **Ethical approval**

396 This study was approved by Research Ethics Committee of Hospital Universitário Pedro  
397 Ernesto (CEP/HUPE– CAAE: 25847614.8.0000.5259).

398

### 399 **Conflict of Interest**

400 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or  
401 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

402

### 403 **Authors Contributions**

404 **LOS:** Data curation; Formal analysis; Writing-original draft; Writing-review and editing;  
405 Investigation; Visualization. **LSS:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and  
406 editing. **MRBA:** Writing-original draft; Investigation; Visualization. **JNR:** Data curation;  
407 Formal analysis; Writing-review and editing. **PVPB:** Data curation; Formal analysis; Writing-  
408 review and editing. **PGC:** Writing-review and editing; Investigation; Resources. **ALMG:**  
409 Conceptualization; Writing-review and editing; Resources; Visualization; Funding  
410 acquisition. **VVV:** Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Writing-review and  
411 editing; Investigation; Methodology; Resources; Visualization; Validation; Funding  
412 acquisition; Project administration; Supervision.

413

### 414 **Funding information**

415 This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Do Ensino  
416 Superior (CAPES) # 88882.450376/2019-01, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à  
417 Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) # E-26/202.088/2020, # E-26/210.889/2019,  
418 and # E-26/211.629/2015, Fundação Oswaldo Cruz (INOVA/FIOCRUZ) # 7481297331, and  
419 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) # 309948/2018-5.

420    **Acknowledgments**

421    We are deeply grateful to our collaborators Dr. Vartul Sangal, Dr. Andreas Burkovski and Dr.  
422    Luis Gustavo Pacheco for their ongoing partnership, and to Rafael Sanches for his availability  
423    to assist in editing the image of this study.

## Reference

- ACOSTA, Pamela *et al.* Encefalopatía hiperamoniémica secundaria a infección urinaria por germen productor de ureasa. Caso clínico pediátrico. *Archivos argentinos de pediatría*, v. 115, n. 6, p. e454–e457, 2017.
- ADDERSON, Elisabeth E. *et al.* Identification of clinical coryneform bacterial isolates: Comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 921–927, 2008.
- ADDERSON, Elisabeth E.; BOUDREAUX, Jan W.; HAYDEN, Randall T. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, n. 2, p. 136–141, 2008.
- AHMAD, Nasir M; AHMAD, Khalid M. *Corynebacterium* minutissimum pyelonephritis with associated bacteraemia: a case report and review of literature. *The Journal of infection*, v. 51, n. 5, p. e299-303, dez. 2005.
- ALATOOM, Adnan A *et al.* Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, v. 50, n. 1, p. 160–163, jan. 2012.
- ALIBI, S. *et al.* Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathologie Biologie*, v. 63, n. 4–5, p. 153–157, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2015.07.007>>.
- ALIBI, S *et al.* Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathologie-biologie*, v. 63, n. 4–5, p. 153–157, set. 2015.
- ALIBI, Sana *et al.* Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

- 449 ALIBI, Sana *et al.* Virulence of clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium*  
 450 *striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces.  
 451 *Microbial pathogenesis*, v. 155, p. 104887, jun. 2021.
- 452 ALTSCHUL, S F *et al.* Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, v.  
 453 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- 454 AMMENTI, Anita *et al.* Updated Italian recommendations for the diagnosis, treatment and  
 455 follow-up of the first febrile urinary tract infection in young children. *Acta paediatrica (Oslo,*  
 456 *Norway : 1992)*, v. 109, n. 2, p. 236–247, fev. 2020.
- 457 ANANIAS, M; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated  
 458 from patients with sepsis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista*  
 459 *brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 41, n. 10, p. 877–883, out. 2008.
- 460 ANTUNES, Camila Azevedo *et al.* *Caenorhabditis elegans* star formation and negative  
 461 chemotaxis induced by infection with corynebacteria. *Microbiology (Reading, England)*, v.  
 462 162, n. 1, p. 84–93, jan. 2016.
- 463 ANTUNES, Camila Azevedo *et al.* Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence  
 464 factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (United Kingdom)*, v. 161, n. 3, p. 639–  
 465 647, 2015.
- 466 ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à  
 467 Saúde. v. 1, p. 44, 2013. Disponível em:  
 468 <[https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca\\_manutencao\\_equipamentos\\_labor](https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca_manutencao_equipamentos_laboratorio_microbiologia.pdf)  
 469 [atorio\\_microbiologia.pdf](https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca_manutencao_equipamentos_laboratorio_microbiologia.pdf)>.
- 470 APARNA, Madhu Sharma; YADAV, Sarita. Biofilms: microbes and disease. *The Brazilian*  
 471 *journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious*  
 472 *Diseases*, v. 12, n. 6, p. 526–530, dez. 2008.
- 473 APERIS, George; MOYSSAKIS, Ioannis. *Corynebacterium minutissimum* endocarditis: a

- 474 case report and review. *The Journal of infection*, v. 54, n. 2, p. e79-81, fev. 2007.
- 475 ARAGÓN, Isabel M *et al.* The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *European*  
 476 *urology focus*, v. 4, n. 1, p. 128–138, jan. 2018.
- 477 ASADI KARAM, Mohammad Reza; HABIBI, Mehri; BOUZARI, Saeid. Urinary tract  
 478 infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against  
 479 Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*, v. 108, n. 69, p. 56–67, 2019.  
 480 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.007>>.
- 481 ATASAYAR, Ewelina *et al.* *Corynebacterium* gottingense sp. nov., isolated from a clinical  
 482 patient. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 67, n. 11, p.  
 483 4494–4499, nov. 2017.
- 484 AYGUN, Gokhan *et al.* A fatal case of urosepsis due to *Corynebacterium riegelii*. *Brazilian*  
 485 *Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 475–476, 2013.
- 486 AZIZ, Ramy K *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology.  
 487 *BMC genomics*, v. 9, p. 75, fev. 2008.
- 488 BADELL, Edgar *et al.* *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae  
 489 species complex. *Research in microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 122–127, 2020.
- 490 BAIQ, Paulo Victor Pereira *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within  
 491 a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*,  
 492 2013.
- 493 BARBERIS, Claudia *et al.* Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry  
 494 system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS*  
 495 *ONE*, v. 9, n. 9, p. 1–6, 2014.
- 496 BARBERIS, Claudia M. *et al.* *Corynebacterium phoceense* – a rare *Corynebacterium* species  
 497 isolated from a urine sample. *Access Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2021.
- 498 BARBERIS, Claudia M. *et al.* Total nephrectomy following *Corynebacterium coyleae*

- 499 urinary tract infection. *JMM Case Reports*, v. 5, n. 9, p. 0–3, 2018.
- 500 BARRACLOUGH, Katherine *et al.* *Corynebacterium* peritonitis in Australian peritoneal  
 501 dialysis patients: Predictors, treatment and outcomes in 82 cases. *Nephrology Dialysis*  
 502 *Transplantation*, v. 24, n. 12, p. 3834–3839, 2009.
- 503 BATEY, R G. Aspects of pathogenesis in a mouse model of infection by *Corynebacterium*  
 504 *pseudotuberculosis*. *The Australian journal of experimental biology and medical science*, v.  
 505 64 ( Pt 3), p. 237–249, jun. 1986.
- 506 BAYRAK, Omer *et al.* Is single-dose fosfomycin trometamol a good alternative for  
 507 asymptomatic bacteriuria in the second trimester of pregnancy? *International urogynecology*  
 508 *journal and pelvic floor dysfunction*, v. 18, n. 5, p. 525–529, maio 2007.
- 509 BECHARA, C *et al.* *Corynebacterium jeikeium* pacemaker infection associated with  
 510 antineutrophil cytoplasmic antibodies: a single positive blood culture could be sufficient for  
 511 diagnosis. *Journal of medical microbiology*, v. 60, n. Pt 2, p. 249–251, fev. 2011.
- 512 BECKFORD-BALL, Jason. Management of suspected bacterial urinary tract infection.  
 513 *Nursing times.*, v. 102, n. 36, p. 25–26, 2006.
- 514 BELMARES, Jaime *et al.* *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and  
 515 outcomes. *BMC infectious diseases*, v. 7, p. 4, fev. 2007.
- 516 BERGIN, I L *et al.* Isolation and characterization of *Corynebacterium ulcerans* from cephalic  
 517 implants in macaques. *Comparative medicine*, v. 50, n. 5, p. 530–535, out. 2000.
- 518 BERNARD, Kathryn. *The genus Corynebacterium and other medically relevant coryneform-*  
 519 *like bacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. [S.l: s.n.], 2012
- 520 BERNARD, Kathryn A.; FUNKE, Guido. *Corynebacterium*. [S.l: s.n.], 2015.
- 521 BERNARD, Kathryn A *et al.* *Corynebacterium hindlerae* sp. nov., derived from a human  
 522 granuloma, which forms black colonies and black halos on modified Tinsdale medium but is  
 523 not closely related to *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa. *International journal of*

- 524 *systematic and evolutionary microbiology*, v. 71, n. 8, ago. 2021.
- 525 BERNIER, Anne Marie; BERNARD, Kathryn. Draft genome sequence for the type strain of
- 526 *Corynebacterium afermentans* LCDC 88-0199T, isolated from a human blood culture.
- 527 *Genome Announcements*, v. 4, n. 4, p. 10–11, 2016.
- 528 BERTUCCINI, Lucia; BALDASSARRI, Lucilla; VON HUNOLSTEIN, Christina.
- 529 Internalization of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory
- 530 epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 37, n. 3, p. 111–118, 2004.
- 531 BILLARD-POMARES, Typhaine *et al.* Diagnosis in France of a Non-Toxigenic tox Gene-
- 532 Bearing Strain of *Corynebacterium diphtheriae* in a Young Male Back From Senegal. *Open*
- 533 *forum infectious diseases*, v. 4, n. 1, p. ofw271, 2017. Disponível em:
- 534 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28480263>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- 535 BININDA-EMONDS, Olaf R.P. The evolution of supertrees. *Trends in Ecology and*
- 536 *Evolution*, v. 19, n. 6, p. 315–322, 2004.
- 537 BIZZINI, A *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
- 538 as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify
- 539 bacterial strains. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 2, p. 693–696, fev. 2011.
- 540 BLÄCKBERG, Anna *et al.* Infective Endocarditis Due to *Corynebacterium* Species: Clinical
- 541 Features and Antibiotic Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, p. 1–6, 2021.
- 542 BONMARIN, Isabelle *et al.* Diphtheria: A zoonotic disease in France? *Vaccine*, v. 27, n. 31,
- 543 p. 4196–4200, 2009.
- 544 BORDE, Kalyani *et al.* Not always a commensal: A case of mastitis by *Corynebacterium*
- 545 *amycolatum*. *IDCases*. [S.l: s.n.], 2020
- 546 BRCAST. BrCAST - Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos
- 547 Antimicrobianos. *Anvisa*, v. 0, p. 1–29, 2021. Disponível em:
- 548 <<http://brcast.org.br/documentos/>>.

- 549 BROADWAY, Melissa M *et al.* Pilus gene pool variation and the virulence of  
 550 *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *Journal of*  
 551 *bacteriology*, v. 195, n. 16, p. 3774–3783, ago. 2013.
- 552 BURKOVSKI, Andreas. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on  
 553 pathogenicity. *ISRN microbiology*, v. 2013, p. 935736, 2013.
- 554 BURKOVSKI, Andreas. Diphtheria and its Etiological Agents. *Corynebacterium diphtheriae*  
 555 *and Related Toxigenic Species*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 1–14. Disponível  
 556 em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7624-1\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7624-1_1)>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- 557 CAMELLO, T. C.F. *et al.* *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant  
 558 clinical sites of infection: A human pathogen overlooked in emerging countries. *Letters in*  
 559 *Applied Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 458–464, 2009.
- 560 CAMELLO, Thereza Cristina Ferreira *et al.* Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated  
 561 from clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian*  
 562 *Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 39–44, 2003.
- 563 CAMPANILE, Floriana *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains,  
 564 Italy. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p. 75–78, 2009.
- 565 CAPOCACCIA, L; ORTALI, V. [A new species of *Corynebacterium*: the *Corynebacterium*  
 566 *mycetoides* (Castellani) Ortali and Capocaccia 1956]. *Rendiconti - Istituto superiore di sanita*,  
 567 v. 19, n. 6, p. 480–491, 1956.
- 568 CAPOCACCIA, L; ORTALI, V; CAPONEBRAGA, P. [Serological reports and antibiogram  
 569 of *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali and Capocaccia 1956]. *Rendiconti -*  
 570 *Istituto superiore di sanita*, v. 20, n. 9–10, p. 860–864, 1957.
- 571 CARVALHO, Ricardo Vianna De *et al.* Central venous catheter-related infections caused by  
 572 *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in  
 573 paediatric oncology patients. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official*

- 574 publication of the *Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 22, n. 4, p. 347–351, 2018.
- 575 CHAO, C T; HUANG, J W; YEN, C J. *A rare and under-recognized pathogen in peritoneal*
- 576 *dialysis peritonitis: Corynebacterium jeikeium. Peritoneal dialysis international : journal of*
- 577 *the International Society for Peritoneal Dialysis*. [S.l: s.n.]. , 2013
- 578 CHEAN, Roy *et al.* Comparing the identification of *Clostridium* spp. by two Matrix-Assisted
- 579 Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to
- 580 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: a detailed analysis of age of culture and
- 581 sampl. *Anaerobe*, v. 30, p. 85–89, dez. 2014.
- 582 CHRISTENSEN, G D *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue
- 583 culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.
- 584 *Journal of clinical microbiology*, v. 22, n. 6, p. 996–1006, dez. 1985.
- 585 CHU, Christine M; LOWDER, Jerry L. Diagnosis and treatment of urinary tract
- 586 infections across age groups. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 219, n. 1, p.
- 587 40–51, jul. 2018.
- 588 CHUN, Jongsik *et al.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the
- 589 taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
- 590 *Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018.
- 591 CHUN, Jongsik; RAINEY, Fred A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics
- 592 of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
- 593 *Microbiology*, v. 64, n. PART 2, p. 316–324, 2014.
- 594 CLARKE, John-Ross D; ABDUR RAHMAN, Manal; SAUL, Zane. A case of recurrent
- 595 *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: Unanswered questions for the treatment of chronic
- 596 endovascular infections. *IDCases*, v. 18, p. e00610, 2019. Disponível em:
- 597 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214250919301404>>.
- 598 COENYE, Tom *et al.* Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology*

- 599 *Reviews*, v. 29, n. 2, p. 147–167, 2005.
- 600 COLGAN, Richard; WILLIAMS, Mozella. Diagnosis and treatment of acute uncomplicated  
601 cystitis. *American Family Physician*, v. 84, n. 7, p. 771–776, 2011.
- 602 COLLINS, M. D. *Corynebacterium mycetoides* sp. nov., nom. rev. *Zentralblatt für*  
603 *Bakteriologie. Allgemeine Angewandte und Okologische Microbiologie Abt. I Orig. C Hyg.*, v.  
604 3, n. 3, p. 399–400, 1982. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0721-9571\(82\)80021-](http://dx.doi.org/10.1016/S0721-9571(82)80021-5)  
605 5>.
- 606 COLLINS, M. D.; JONES, D. *Corynebacterium minutissimum* sp. nov., nom. rev.  
607 *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 33, n. 4, p. 870–871, 1 out. 1983.  
608 Disponível em:  
609 <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-33-4-870>>.  
610 Acesso em: 10 jan. 2022.
- 611 COLLINS, Matthew D; BURTON, Ruth A; JONES, Dorothy. *Corynebacterium amycolatum*  
612 sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS*  
613 *Microbiology Letters*, v. 49, n. 3, p. 349–352, 1 mar. 1988. Disponível em:  
614 <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02755.x>>.
- 615 COLOMBO, A V *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human  
616 erythrocytes. *FEMS microbiology letters*, v. 197, n. 2, p. 235–239, abr. 2001.
- 617 CORDEIRO, Melina Aparecida *et al.* Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated  
618 with human cystitis. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society*  
619 *for Microbiology]*, v. 47, n. 2, p. 414–416, 2016.
- 620 CORTES-PENFIELD, Nicolas W; TRAUTNER, Barbara W; JUMP, Robin L P. Urinary  
621 Tract Infection and Asymptomatic Bacteriuria in Older Adults. *Infectious disease clinics of*  
622 *North America*, v. 31, n. 4, p. 673–688, dez. 2017.
- 623 COSTA, Lilia F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite

- caseosa em caprinos *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the ethiological agent of the caseous lymphadenitis in goats Palavras-chave Características do microrganismo e seu cultivo. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 1, n. 1, p. 105–115, 2002.
- CRESCI, M *et al.* *Corynebacterium phoceense* sp. nov., strain MC1(T) a new bacterial species isolated from human urine. *New microbes and new infections*, v. 14, p. 73–82, nov. 2016.
- CRUM-CIANFLONE, Nancy F; BALLON-LANDA, Gonzalo; ZORN, George. Photo Quiz. Recurrent breast abscess in a 33-year-old woman. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 59, n. 3, p. 410; 454–5, ago. 2014.
- CURRY, Chelsea R. *et al.* Encrusted cystitis secondary to *Corynebacterium glucuronolyticum* in a 57-year-old man without predisposing factors. *Laboratory Medicine*, v. 46, n. 2, p. 136–139, 2015.
- DA ROCHA, Jaqueline Abel *et al.* Early prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum*: the first case reported in Brazil. *Journal of infection in developing countries*, v. 12, n. 9, p. 806–807, set. 2018.
- DA SILVA TRENTIN, Danielle; BRANDT GIORDANI, Raquel; MACEDO, Alexandre José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate1. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213–236, 2013.
- DALAL, Aman; LIKHI, Rishi. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. *The Journal of infection*, v. 56, n. 1, p. 77–79, jan. 2008.
- DANESHVAR, Maryam I. *et al.* Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium anmucosum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p. 4189–4198, 2004.

- 649 DANGEL, Alexandra *et al.* *Corynebacterium* silvaticum sp. nov., a unique group of NTTB  
 650 corynebacteria in wild boar and roe deer. *International journal of systematic and*  
 651 *evolutionary microbiology*, v. 70, n. 6, p. 3614–3624, jun. 2020.
- 652 DAZAS, Melody *et al.* Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and  
 653 proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *International journal of systematic and*  
 654 *evolutionary microbiology*, v. 68, n. 12, p. 3826–3831, dez. 2018.
- 655 DE MIGUEL, I; RODRÍGUEZ, E; MARTÍN, A M. [*Corynebacterium amycolatum*: sepsis in  
 656 hematologic patients]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, v. 17, n. 7, p. 340–  
 657 341, 1999.
- 658 DE SANTIS, Antonio *et al.* Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infective  
 659 endocarditis with embolic events: a case report. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 1–5,  
 660 2020.
- 661 DE SOUZA, Cassius *et al.* Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum*  
 662 associated with nosocomial outbreak. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 2, p.  
 663 242–248, 2015.
- 664 DE ZOYSA, Aruni *et al.* Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains  
 665 isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *Journal of Clinical*  
 666 *Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4377–4381, 2005.
- 667 DEVRIESE, L. A. *et al.* Identification of *Corynebacterium glucuronolyticum* strains from the  
 668 urogenital tract of humans and pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 12, p. 4657–  
 669 4659, 2000.
- 670 DIAS, Alexandre A.S.O. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* Isolated from an Asymptomatic  
 671 Dog Kept in an Animal Shelter in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil . *Vector-*  
 672 *Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 8, p. 743–748, 2010.
- 673 DIAS, Alexandre Alves de Souza de Oliveira *et al.* *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: An

674 emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de Saude Publica*, v. 45, n. 6, p. 1176–  
 675 1191, 2011.

676 DIOP, Khoudia *et al.* *Corynebacterium* *fournierii* sp. nov., isolated from the female genital  
 677 tract of a patient with bacterial vaginosis. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, n. 7, p. 1165–  
 678 1174, jul. 2018.

679 DONLAN, Rodney M; COSTERTON, J William. Biofilms: survival mechanisms of  
 680 clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 2, p. 167–193,  
 681 abr. 2002.

682 DORELLA, Fernanda Alves *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology,  
 683 biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary*  
 684 *research*, v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006.

685 DOS SANTOS, Cíntia Silva *et al.* Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic  
 686 and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages.  
 687 *Microbiology and immunology*, v. 54, n. 1, p. 1–10, 2010.

688 DOS SANTOS, Louisy Sanches *et al.* Tellurite resistance: a putative pitfall in  
 689 *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of*  
 690 *General and Molecular Microbiology*, 2015.

691 DOWLING, Wentzel Bruce; KOEN, Johan. *Corynebacterium jeikeium* native valve infective  
 692 endocarditis case report: a confirmed microbiological and pathological diagnosis from heart  
 693 valvular tissue. *European heart journal. Case reports*, v. 4, n. 6, p. 1–4, dez. 2020.

694 DYKHUIZEN, Roelf S. *et al.* *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: Multiple  
 695 abscess formation in brain and liver. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, n. 6,  
 696 p. 637–639, 1995.

697 EISENBERG, Tobias *et al.* Nontoxigenic tox-bearing *Corynebacterium ulcerans* infection  
 698 among game animals, Germany. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 3, p. 448–452, mar.

- 699 2014.
- 700 ESKANDAR, Samantha *et al.* Draft Genome Sequence of *Corynebacterium aurimucosum*  
 701 UMB7769, Isolated from the Female Urinary Tract. *Microbiology resource announcements*,  
 702 v. 9, n. 22, maio 2020.
- 703 ESTEBAN, J *et al.* Microbiological characterization and clinical significance of  
 704 *Corynebacterium amycolatum* strains. *European journal of clinical microbiology &*  
 705 *infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, v.  
 706 18, n. 7, p. 518–521, jul. 1999.
- 707 F., González-Chamorro *et al.* Urinary tract infections and their prevention. *Actas Urológicas*  
 708 *Espanolas*, v. 36, n. 1, p. 48–53, 2012. Disponível em:  
 709 <[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L5152012](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L51520122%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2011.05.002)  
 710 [2%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2011.05.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2011.05.002)>.
- 711 FARRELL, Maureen; DEMPSEY, Jennifer. *Smeltzer & Bare's textbook of medical-surgical*  
 712 *nursing*. Third edit ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins,  
 713 2014.
- 714 FERNÁNDEZ-NATAL, M. I. *et al.* The isolation of *Corynebacterium coyleae* from clinical  
 715 samples: Clinical and microbiological data. *European Journal of Clinical Microbiology and*  
 716 *Infectious Diseases*, v. 27, n. 3, p. 177–184, 2008.
- 717 FERNANDEZ-PITTOL, M *et al.* Skin infection by *Corynebacterium diphtheriae* and  
 718 *Streptococcus pyogenes*: an unusual association. *Enfermedades infecciosas y microbiologia*  
 719 *clinica (English ed.)*. [S.l: s.n.], dez. 2019
- 720 FERNANDEZ-ROBLAS, R *et al.* In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials  
 721 against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *International Journal of Antimicrobial*  
 722 *Agents*, v. 33, n. 5, p. 453–455, 2009. Disponível em:  
 723 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092485790800589X>>.

- 724 FERNÁNDEZ GUERRERO, Manuel L *et al.* Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*  
 725 endocarditis successfully treated with daptomycin. *International journal of antimicrobial*  
 726 *agents*. Netherlands: [s.n.], out. 2012
- 727 FESSLER, Andrea T.; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial Resistance in *Corynebacterium*  
 728 spp., *Arcanobacterium* spp., and *Trueperella pyogenes*. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 6,  
 729 2017.
- 730 FLORES-MIRELES, Ana; HREHA, Teri N; HUNSTAD, David A. Pathophysiology,  
 731 Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Topics in spinal*  
 732 *cord injury rehabilitation*, v. 25, n. 3, p. 228–240, 2019.
- 733 FUCHS, Frieder *et al.* diphtheriae – Associated Genital Ulceration. v. 26, n. 9, p. 9–10, 2020.
- 734 FUNKE, G *et al.* Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical microbiology*  
 735 *reviews*, v. 10, n. 1, p. 125–159, jan. 1997.
- 736 FUNKE, G; PETERS, K; ARAVENA-ROMAN, M. Evaluation of the RapID CB plus system  
 737 for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. *Journal of clinical microbiology*, v.  
 738 36, n. 9, p. 2439–2442, set. 1998.
- 739 FUNKE, Guido *et al.* *Clinical microbiology of Coryneform bacteria*. [S.l: s.n.], 1997. v. 10.
- 740 FUNKE, Guido *et al.* Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical  
 741 laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.  
 742 34, n. 5, p. 1124–1128, 1996.
- 743 FUNKE, Guido; LAWSON, Paul A.; COLLINS, Matthew D. *Corynebacterium riegelii* sp.  
 744 nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *Journal of*  
 745 *Clinical Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 624–627, 1998.
- 746 GALAN-SANCHEZ, Fátima *et al.* Urethritis due to *Corynebacterium glucuronolyticum*.  
 747 *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 17, n. 5, p. 720–721, 2011.
- 748 GALAZKA, Artur M; ROBERTSON, Susan E. Immunization against diphtheria with special

- 749 emphasis on immunization of adults. *Vaccine*, v. 14, n. 9, p. 845–857, 1996. Disponível em:  
 750 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0264410X96000217>>.
- 751 GAO, Xin Lei *et al.* Airborne bacterial contaminations in typical Chinese wet market with  
 752 live poultry trade. *Science of the Total Environment*, v. 572, p. 681–687, 2016.
- 753 GASPAR, Andrew H; TON-THAT, Hung. Assembly of distinct pilus structures on the  
 754 surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 4, p. 1526–1533,  
 755 fev. 2006.
- 756 GHERARDI, G *et al.* *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract  
 757 infection: Case report and review of the literature. *IDCases*, v. 2, n. 2, p. 56–58, 2015.
- 758 GOMES, Débora L.R. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in  
 759 nephrostomy catheter-related infection: Evaluation of traits associated with bacterial  
 760 virulence. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 1419–1427, 2009.
- 761 GORIS, Johan *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome  
 762 sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.  
 763 57, n. 1, p. 81–91, 2007.
- 764 GUIMARAES, L. C. *et al.* Complete Genome Sequence of *Corynebacterium urealyticum*  
 765 Strain DSM 7111, Isolated from a 9-Year-Old Patient with Alkaline-Encrusted Cystitis.  
 766 *Genome Announcements*, v. 1, n. 3, p. 2008–2009, 2013.
- 767 GUPTA, Kalpana *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute  
 768 uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious  
 769 Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious  
 770 Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 5, p. 103–120, 2011.
- 771 GUPTA, Kalpana; GRIGORYAN, Larissa; TRAUTNER, Barbara. In the clinic® urinary  
 772 tract infection. *Annals of Internal Medicine*, v. 167, n. 7, p. ITC49–ITC64, 2017a.
- 773 GUPTA, Kalpana; GRIGORYAN, Larissa; TRAUTNER, Barbara. Urinary Tract Infection.

- 774 *Annals of internal medicine*, v. 167, n. 7, p. ITC49–ITC64, out. 2017b.
- 775 HAHN, William O *et al.* Multidrug-Resistant *Corynebacterium striatum* Associated with  
 776 Increased Use of Parenteral Antimicrobial Drugs. *Emerging infectious diseases*, v. 22, n. 11,  
 777 p. 1908–1914, nov. 2016.
- 778 HARD, G C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on  
 779 peritoneal macrophages. *Infection and immunity*, v. 12, n. 6, p. 1439–1449, dez. 1975.
- 780 HAUSER, D. *et al.* Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic  
 781 *Corynebacterium diphtheriae* strains: Correlation with ADP-ribosylation activity assay.  
 782 *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 10, p. 2720–2723, 1993.
- 783 HAYASHI SANT’ANNA, Fernando *et al.* Genomic metrics made easy: what to do and  
 784 where to go in the new era of bacterial taxonomy. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 45, n.  
 785 2, p. 182–200, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1569587>>.
- 786 HENNART, Melanie *et al.* Population genomics and antimicrobial resistance in  
 787 *Corynebacterium diphtheriae*. *bioRxiv*, p. 1–18, 2020.
- 788 HIRATA, Raphael *et al.* Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*  
 789 strains in HEp-2 cells. *FEMS microbiology letters*, v. 215, n. 1, p. 115–119, set. 2002.
- 790 HIRATA, Raphael Jr *et al.* Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by  
 791 toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbial pathogenesis*, v. 36, n. 3, p. 125–  
 792 130, mar. 2004.
- 793 HOCAOĞLU, Meryem *et al.* Maternal ventriculoperitoneal shunt infection due to  
 794 *Corynebacterium xerosis* following caesarean section. *Journal of Obstetrics and*  
 795 *Gynaecology*, v. 39, n. 3, p. 400–402, 2019. Disponível em:  
 796 <<https://doi.org/10.1080/01443615.2018.1457633>>.
- 797 HODGKIN, Jonathan *et al.* Two Leucobacter strains exert complementary virulence on  
 798 Caenorhabditis including death by worm-star formation. *Current biology : CB*, v. 23, n. 21, p.

- 799 2157–2161, nov. 2013.
- 800 HOLMES, R K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene.  
801 *The Journal of infectious diseases*, v. 181 Suppl, p. S156-67, fev. 2000.
- 802 HUGENHOLTZ, Philip *et al.* Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big  
803 sequence data. *ISME Journal*, v. 15, n. 7, p. 1879–1892, 2021. Disponível em:  
804 <<http://dx.doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x>>.
- 805 JACKMAN, Peter J H *et al.* Classification of corynebacteria associated with endocarditis  
806 (group JK) as *Corynebacterium jeikeium* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 9,  
807 n. 1, p. 83–90, 1987. Disponível em:  
808 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202087800607>>.
- 809 JAÉN-LUCHORO, Daniel *et al.* *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and  
810 environmental associated *Corynebacterium*. *Systematic and applied microbiology*, v. 43, n. 1,  
811 p. 126039, jan. 2020.
- 812 JORGENSEN, Ine; SEED, Patrick C. How to Make It in the Urinary Tract: A Tutorial by  
813 *Escherichia coli*. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 10, p. e1002907, 4 out. 2012. Disponível em:  
814 <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002907>>.
- 815 KALT, Fabian *et al.* *Corynebacterium* species rarely cause orthopedic infections. *Journal of*  
816 *Clinical Microbiology*, v. 56, n. 12, p. 1–8, 2018.
- 817 KAMMOUN, M M *et al.* [*Corynebacterium striatum meningitis*]. *Medecine et maladies*  
818 *infectieuses*. France: [s.n.], dez. 2016
- 819 KATES, Olivia; STARR, Kimberly; BOURASSA, Lori. Closing the brief case: nontoxigenic  
820 *Corynebacterium diphtheriae* in a nonhealing wound. *Journal of Clinical Microbiology*, v.  
821 58, n. 12, p. 1–5, 2020.
- 822 KHAMIS, Atieh; RAOULT, Didier; LA SCOLA, Bernard. rpoB gene sequencing for  
823 identification of *Corynebacterium* species. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 9, p.

- 824 3925–3931, set. 2004.
- 825 KHAMIS, Atieh; RAOULT, Didier; SCOLA, Bernard La. Comparison between rpoB and  
826 16S rRNA Gene Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of  
827 *Corynebacterium*. v. 43, n. 4, p. 1934–1936, 2005.
- 828 KHARE, Baldeep; V. L. NARAYANA, Sthanam. Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria:  
829 Roles of sortases and implications for assembly. *Protein Science*, v. 26, n. 8, p. 1458–1473,  
830 2017.
- 831 KIM, Seonghun *et al.* Identification and functional characterization of the NanH extracellular  
832 sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of biochemistry*, v. 147, n. 4, p. 523–  
833 533, abr. 2010.
- 834 KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions  
835 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, v. 16,  
836 n. 2, p. 111–120, dez. 1980.
- 837 KIMURA, Shun-Ichi *et al.* Clinical characteristics and predictive factors for mortality in  
838 coryneform bacteria bloodstream infection in hematological patients. *Journal of infection and*  
839 *chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 23, n. 3, p. 148–  
840 153, mar. 2017.
- 841 KISHORE, C K *et al.* Gangrene and bacteremia due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient  
842 on maintenance hemodialysis. *Indian journal of nephrology*, v. 25, n. 5, p. 317–318, 2015.
- 843 KLEIN, Roger D; HULTGREN, Scott J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis,  
844 host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature reviews. Microbiology*, v. 18,  
845 n. 4, p. 211–226, abr. 2020.
- 846 KLINE, Kimberly A; LEWIS, Amanda L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial  
847 Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiology*  
848 *spectrum*, v. 4, n. 2, abr. 2016.

- 849 KONINGSTEIN, Maike *et al.* Recommendations for the empirical treatment of complicated  
 850 urinary tract infections using surveillance data on antimicrobial resistance in the Netherlands.  
 851 *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, 2014.
- 852 KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across  
 853 Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, jun. 2018.
- 854 KUMARI, P *et al.* *Corynebacterium afermentans* spp. *afermentans* sepsis in a neurosurgical  
 855 patient. *The Journal of infection*, v. 35, n. 2, p. 201–202, 1997. Disponível em:  
 856 <<http://europepmc.org/abstract/MED/9354364>>.
- 857 KURIA, J K; HOLSTAD, G. Serological investigation of *Corynebacterium*  
 858 *pseudotuberculosis* infection in sheep--correlation between the hemolysis inhibition test and  
 859 the ELISA test. *Acta veterinaria Scandinavica*, v. 30, n. 1, p. 109–110, 1989.
- 860 LALA, Vasimahmed; MINTER, David A. Acute Cystitis. Treasure Island (FL): [s.n.], 2021. .
- 861 LEAL, Sixto M.; JONES, Melissa; GILLIGAN, Peter H. Clinical significance of commensal  
 862 gram-positive rods routinely isolated from patient samples. *Journal of Clinical Microbiology*,  
 863 v. 54, n. 12, p. 2928–2936, 2016.
- 864 LEE, Ja Yeon; LEE, Sun Hwa; KIM, Won Ho. Three-valve endocarditis caused by  
 865 *Corynebacterium striatum*. *Korean Circulation Journal*, v. 48, n. 9, p. 861–862, 2018.
- 866 LEFÈVRE, Charles R. *et al.* Clinical relevance and antimicrobial susceptibility profile of the  
 867 unknown human pathogen *Corynebacterium aurimucosum*. *Journal of Medical Microbiology*,  
 868 v. 70, n. 3, p. 001334, 1 mar. 2021. Disponível em:  
 869 <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001334>>.
- 870 Acesso em: 5 ago. 2021.
- 871 LENZ, LI. Cateterismo vesical: cuidados, complicações e medidas preventivas. *Arquivos*  
 872 *Catarinenses de Medicina*, v. 35, p. 82–91, 2006. Disponível em:  
 873 <<http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/361.pdf>>.

- 874 LO, Seynabou *et al.* Urinary tract infection with *Corynebacterium aurimucosum* after  
 875 urethroplasty stricture of the urethra: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, v. 9, n.  
 876 1, p. 1–3, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13256-015-0638-0>>.
- 877 LÓPEZ-GONZÁLEZ GILA, J D *et al.* [*Corynebacterium jeikeium* urinary tract infection and  
 878 good clinical response with nitrofurantoin treatment]. *Revista espanola de quimioterapia :*  
 879 *publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*. [S.l: s.n.]. , fev. 2019
- 880 LÓPEZ-MEDRANO, F *et al.* Urinary tract infection due to *Corynebacterium urealyticum* in  
 881 kidney transplant recipients: an underdiagnosed etiology for obstructive uropathy and graft  
 882 dysfunction-results of a prospective cohort study. *Clinical infectious diseases : an official*  
 883 *publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 46, n. 6, p. 825–830, mar. 2008.
- 884 LÓPEZ, Alicia Beteta *et al.* Cistitis y hematuria por *Corynebacterium striatum*. A propósito  
 885 de un caso y revisión de la literatura científica. *Actas Urologicas Espanolas*, v. 33, n. 8, p.  
 886 909–912, 2009.
- 887 MAGIORAKOS, A-P *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-  
 888 resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for  
 889 acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the*  
 890 *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 268–281,  
 891 mar. 2012.
- 892 MAGISTRO, Giuseppe; STIEF, Christian G. The Urinary Tract Microbiome: The Answer to  
 893 All Our Open Questions? *European urology focus*, v. 5, n. 1, p. 36–38, jan. 2019.
- 894 MAHATO, Nitish Kumar *et al.* Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of  
 895 DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek*,  
 896 *International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 110, n. 10, p. 1357–1371,  
 897 2017.
- 898 MAHESWARI, Uma B *et al.* Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers

- 899 of uropathogenic *Escherichia coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Indian*  
 900 *journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India*, v. 29, n. 4, p. 277–281,  
 901 out. 2013.
- 902 MAKI, D G; WEISE, C E; SARAFIN, H W. A semiquantitative culture method for  
 903 identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England journal of medicine*, v.  
 904 296, n. 23, p. 1305–1309, jun. 1977.
- 905 MANCINI, Fabiola *et al.* Identification and molecular discrimination of toxigenic and  
 906 nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain  
 907 reaction assays. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 73, n. 2, p. 111–120, jun.  
 908 2012.
- 909 MANDLIK, Anjali *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target  
 910 human pharyngeal epithelial cells. *Molecular microbiology*, v. 64, n. 1, p. 111–124, abr.  
 911 2007.
- 912 MARRIE, T J; COSTERTON, J W. Scanning and transmission electron microscopy of in situ  
 913 bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *Journal of clinical*  
 914 *microbiology*, v. 19, n. 5, p. 687–693, maio 1984.
- 915 MARTINS, C. A.S. *et al.* Microbiological and host features associated with corynebacteriosis  
 916 in cancer patients: A five-year study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 6, p.  
 917 905–913, 2009.
- 918 MATSUNAMI, Masatoshi *et al.* Urosepsis caused by *Globicatella sanguinis* and  
 919 *Corynebacterium riegelii* in an adult: case report and literature review. *Journal of infection*  
 920 *and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 18, n. 4, p.  
 921 552–554, ago. 2012.
- 922 MATTOS-GUARALDI, A L; DUARTE FORMIGA, L C; PEREIRA, G A. Cell surface  
 923 components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes and infection*, v. 2, n.

- 12, p. 1507–1512, out. 2000.
- MATTOS-GUARALDI, A L; FORMIGA, L C. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 24, n. 4, p. 399–406, 1991.
- MATTOS-GUARALDI, A L; FORMIGA, L C; ANDRADE, A F. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current microbiology*, v. 38, n. 1, p. 37–42, jan. 1999.
- MAUREY, C. *et al.* Clinical description of *Corynebacterium urealyticum* urinary tract infections in 11 dogs and 10 cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 60, n. 4, p. 239–246, 2019.
- MCCONNELL, Scott A *et al.* Protein Labeling via a Specific Lysine-Isopeptide Bond Using the Pilin Polymerizing Sortase from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 27, p. 8420–8423, jul. 2018.
- MCLELLAN, Lisa K.; HUNSTAD, David A. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, v. 22, n. 11, p. 946–957, 2016.
- MCMULLEN, Allison R *et al.* When Good Bugs Go Bad : Epidemiology and Antimicrobial Resistance Profiles of Pathogen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 11, p. 1–10, 2017a.
- MCMULLEN, Allison R *et al.* When Good Bugs Go Bad: Epidemiology and Antimicrobial Resistance Profiles of *Corynebacterium striatum*, an Emerging Multidrug-Resistant, Opportunistic Pathogen. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 11, nov. 2017b.
- MEIER-KOLTHOFF, Jan P *et al.* Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, v. 14, p. 60, fev. 2013.

- 949 MEIER-KOLTHOFF, Jan P; GÖKER, Markus. TYGS is an automated high-throughput  
 950 platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p.  
 951 2182, maio 2019.
- 952 MEINEL, Dominik M. *et al.* Next generation sequencing analysis of nine *Corynebacterium*  
 953 *ulcerans* isolates reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria toxin-encoding  
 954 pathogenicity island. *Genome Medicine*, v. 6, n. 11, p. 1–13, 2014.
- 955 MELTON-CELSA, Angela R. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function.  
 956 *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 4, p. 1–21, 2014.
- 957 MEŠTROVIĆ, Tomislav *et al.* A ‘pathogenic needle’ in a ‘commensal haystack’: Genetic  
 958 virulence signatures of *Corynebacterium glucuronolyticum* that may drive its infectious  
 959 propensity for the male urogenital system. *Medical Hypotheses*, v. 126, n. March, p. 38–41,  
 960 2019.
- 961 MINKIN, Ruth; SHAPIRO, Janet M. *Corynebacterium afermentans* Lung Abscess and  
 962 Empyema in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Southern Medical*  
 963 *Journal*, v. 97, n. 4, p. 395–397, 2004.
- 964 MOORE PARDO, Shylah M *et al.* Disseminated *Corynebacterium jeikeium* Infection in  
 965 Cancer Patients. *Cureus*, v. 12, n. 6, p. 6–13, 2020.
- 966 MORAES, Gleiciane *et al.* Homology modeling, molecular dynamics and QM/MM study of  
 967 the regulatory protein PhoP from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of molecular*  
 968 *modeling*, v. 18, n. 3, p. 1219–1227, mar. 2012.
- 969 MOSSER, Thomas; MATIC, Ivan; LEROY, Magali. Bacterium-induced internal egg  
 970 hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Applied*  
 971 *and environmental microbiology*, v. 77, n. 22, p. 8189–8192, nov. 2011.
- 972 MOTHERSHED, Elizabeth A *et al.* Development of a real-time fluorescence PCR assay for  
 973 rapid detection of the diphtheria toxin gene. *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 12, p.

- 974 4713–4719, dez. 2002.
- 975 MUNGELLUZZI, C; CAPRILLI, F. [*Corynebacterium mycetoides*, (Castellani) Ortali and  
 976 Capocaccia, 1956. Etiologic agent of tropical ulcer]. *Archivio italiano di scienze mediche*  
 977 *tropicali e di parassitologia*, v. 46, n. 7, p. 301–304, 1965.
- 978 NICOLLE, L E. Complicated urinary tract infection in adults. *The Canadian journal of*  
 979 *infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et*  
 980 *de la microbiologie medicale*, v. 16, n. 6, p. 349–360, nov. 2005.
- 981 NOVO-VELEIRO, I. *et al.* Paucisymptomatic infectious prostatitis as a cause of fever  
 982 without an apparent origin. A series of 19 patients. *European Journal of Clinical*  
 983 *Microbiology and Infectious Diseases*, v. 32, n. 2, p. 263–268, 2013.
- 984 NUDEL, K *et al.* Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant  
 985 pathogen of immunocompromised patients. *Clinical microbiology and infection : the official*  
 986 *publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 24,  
 987 n. 9, p. 1016.e7-1016.e13, set. 2018.
- 988 ODABASI, Zekaver; MERT, Ali. Candida urinary tract infections in adults. *World Journal of*  
 989 *Urology*, v. 38, n. 11, p. 2699–2707, 2020. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/s00345-](https://doi.org/10.1007/s00345-019-02991-5)  
 990 [019-02991-5](https://doi.org/10.1007/s00345-019-02991-5)>.
- 991 OLENDER, Alina; LETOWSKA, Iwona. [Wound infections due to opportunistic  
 992 *Corynebacterium* species]. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, v. 62, n. 2, p. 135–140,  
 993 2010.
- 994 OLIVEIRA, Alberto *et al.* *Insight of Genus Corynebacterium: Ascertaining the Role of*  
 995 *Pathogenic and Non-pathogenic Species* . *Frontiers in Microbiology* . [S.l: s.n.]. Disponível  
 996 em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01937>>. , 2017
- 997 ÖLMEZ, Serpil *et al.* Comparison of Conventional Methods, Automated Systems, and DNA  
 998 Sequence Analysis Methods in the Identification of *Corynebacterium afermentans* and

- 999 *Corynebacterium mucifaciens* Bacteria Isolated from Blood and Catheter Culture Samples.
- 1000 *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, v. 27, n. 7, p. 919–923, jul. 2021.
- 1001 OTEO, J *et al.* [Significant bacteremias by *Corynebacterium amycolatum*: an emergent
- 1002 pathogen]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, v. 19, n. 3, p. 103–106, mar.
- 1003 2001.
- 1004 OTSUKA, Yoshihito *et al.* *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant
- 1005 coryneform bacterium isolated from human infections. *Journal of Clinical Microbiology*,
- 1006 2005.
- 1007 OTT, Lisa. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS microbiology*, v. 4, n. 1, p.
- 1008 85–103, 2018.
- 1009 OTT, Lisa *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is
- 1010 involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC*
- 1011 *Microbiology*, v. 10, 2010.
- 1012 OTT, Lisa *et al.* Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria.
- 1013 *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 413–421, 2012.
- 1014 OUMER, Yisiak *et al.* Catheter-Associated Urinary Tract Infection: Incidence, Associated
- 1015 Factors and Drug Resistance Patterns of Bacterial Isolates in Southern Ethiopia. *Infection and*
- 1016 *drug resistance*, v. 14, p. 2883–2894, 2021.
- 1017 PACHECO, Luis G. C. *et al.* Draft Genome Sequences of Two Species of “Difficult-to-
- 1018 Identify” Human-Pathogenic Corynebacteria: Implications for Better Identification Tests.
- 1019 *Journal of Genomics*, v. 3, p. 82–84, 2015.
- 1020 PACHECO, Luis G C *et al.* A Role for Sigma Factor  $\sigma(E)$  in *Corynebacterium*
- 1021 *pseudotuberculosis* Resistance to Nitric Oxide/Peroxide Stress. *Frontiers in microbiology*, v.
- 1022 3, p. 126, 2012.
- 1023 PADMANABHAN, Roshan *et al.* Genome sequence and description of *Corynebacterium*

- 1024 ihmii sp. nov. *Standards in genomic sciences*, v. 9, n. 3, p. 1128–1143, jun. 2014.
- 1025 PALLEN, M J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the  
 1026 polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology*, v. 44, n. 12, p. 1025–1026, dez.  
 1027 1991.
- 1028 PALLETT, Ann; HAND, Kieran. Complicated urinary tract infections: practical solutions for  
 1029 the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *The Journal of antimicrobial*  
 1030 *chemotherapy*, v. 65 Suppl 3, p. iii25-33, nov. 2010.
- 1031 PALMER, Marike *et al.* All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species  
 1032 boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy. *International Journal of*  
 1033 *Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2937–2948, 1 abr. 2020. Disponível  
 1034 em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004124>>.  
 1035 Acesso em: 12 ago. 2021.
- 1036 PARTE, Aidan C *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)  
 1037 moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v.  
 1038 70, n. 11, p. 5607–5612, nov. 2020.
- 1039 PAZ-ZARZA, Victor Manuel *et al.* [Pseudomonas aeruginosa: Pathogenicity and  
 1040 antimicrobial resistance in urinary tract infection]. *Revista chilena de infectologia : organo*  
 1041 *oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, v. 36, n. 2, p. 180–189, abr. 2019.
- 1042 PEIXOTO, Renata Stavracakis *et al.* Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae*  
 1043 strain isolated from a case of osteomyelitis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 11, p.  
 1044 1311–1321, nov. 2016.
- 1045 PICHON, M. *et al.* A rare case of *Corynebacterium riegellii* urosepsis: Role of the MALDI-  
 1046 TOF mass spectrometry in the identification of emerging pathogens. *Medecine et Maladies*  
 1047 *Infectieuses*, v. 49, n. 6, p. 474–477, 2019. Disponível em:  
 1048 <<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.06.005>>.

- 1049 PITCHER, D *et al.* Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract  
 1050 infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *International journal of*  
 1051 *systematic bacteriology*, v. 42, n. 1, p. 178–181, jan. 1992.
- 1052 PORTEVIN, Damien *et al.* A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of  
 1053 mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the*  
 1054 *National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 1, p. 314–319, jan.  
 1055 2004.
- 1056 PROCOP, Gary W. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* . Seventh  
 1057 ed ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.
- 1058 RAMASAMY, Dhamodharan *et al.* A polyphasic strategy incorporating genomic data for the  
 1059 taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and*  
 1060 *Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. PART 2, p. 384–391, 2014.
- 1061 RAMOS, Juliana Nunes *et al.* Bloodstream and catheter-related infections due to different  
 1062 clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC*  
 1063 *infectious diseases*, v. 19, n. 1, p. 672, jul. 2019.
- 1064 RAMOS, Juliana Nunes *et al.* Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium*  
 1065 *striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro,  
 1066 Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 9, p. e180051, 2018.
- 1067 RIEGEL, P. *et al.* Taxonomic study of *Corynebacterium* group ANF-1 strains: Proposal of  
 1068 *Corynebacterium afermentans* sp. nov. containing the subspecies *C. afermentans* subsp.  
 1069 *afermentans* subsp. nov. and *C. afermentans* subsp. *lipophilum* subsp. nov. *International*  
 1070 *Journal of Systematic Bacteriology*, v. 43, n. 2, p. 287–292, 1993.
- 1071 RIZVI, Meher *et al.* Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical  
 1072 site infections in a tertiary care hospital of North India. *Journal of infection and public*  
 1073 *health*, v. 6, n. 4, p. 283–288, ago. 2013.

- 1074 ROACH, David J. *et al.* A Year of Infection in the Intensive Care Unit: Prospective Whole  
 1075 Genome Sequencing of Bacterial Clinical Isolates Reveals Cryptic Transmissions and Novel  
 1076 Microbiota. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 7, p. 1–21, 2015.
- 1077 ROBERT, Kuthan; ANNA, Sawicka-Grzelak; GRAŻYNA, Mlynarczyk. *Corynebacterium*  
 1078 Species Causing Urinary Tract Infections. *Microbiology Research Journal International*, v.  
 1079 24, n. 5, p. 1–9, 2018.
- 1080 ROCHA, Danilo J.P. *et al.* Whole-genome sequencing reveals misidentification of a  
 1081 multidrug-resistant urine clinical isolate as *Corynebacterium urealyticum*. *Journal of Global*  
 1082 *Antimicrobial Resistance*, v. 23, p. 16–19, 2020.
- 1083 RODRIGUEZ-R, Luis M.; KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. Bypassing Cultivation To  
 1084 Identify Bacterial Species Identify Bacterial Species. *Microbe*, v. 9, n. 3, p. 111–118, 2014.
- 1085 ROTH, Sophie *et al.* Late-onset native valve endocarditis caused by *Corynebacterium*  
 1086 *kroppenstedtii*. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the*  
 1087 *International Society for Infectious Diseases*. Canada: [s.n.], dez. 2020
- 1088 ROY, Moni; AHMAD, Sharjeel. Rare case of *Corynebacterium striatum* septic arthritis. *BMJ*  
 1089 *case reports*, v. 2016, 23 set. 2016. Disponível em:  
 1090 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664229>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- 1091 RUIZ-PINO, M *et al.* Male genitourinary infections by *Corynebacterium glucuronolyticum*. A  
 1092 review and clinical experience. *Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la*  
 1093 *Sociedad Espanola de Quimioterapia*. [S.l: s.n.], out. 2019
- 1094 RYCHERT, Jenna. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the  
 1095 Identification of Microorganisms. *Journal of Infectiology*, v. 2, n. 4, p. 1–5, 2019.
- 1096 SABBADINI, Priscila Soares *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin,  
 1097 characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in  
 1098 HEp-2 cells. *Microbial pathogenesis*, v. 52, n. 3, p. 165–176, mar. 2012.

- 1099 SABBADINI, Priscila Soares *et al.* Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic  
 1100 *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 5, p.  
 1101 706–711, ago. 2010.
- 1102 SABINO, Yasmin Neves Vieira *et al.* Characterization of antibiotic resistance genes in the  
 1103 species of the rumen microbiota. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em:  
 1104 <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13118-0>>.
- 1105 SAKHI, Hamza *et al.* Encrusted Urinary Tract Infections Due to *Corynebacteria* Species.  
 1106 *Kidney International Reports*, v. 6, n. 1, p. 179–186, 2021. Disponível em:  
 1107 <<https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.10.034>>.
- 1108 SALEM, Nagla *et al.* *Corynebacterium urealyticum*: A comprehensive review of an  
 1109 understated organism. *Infection and Drug Resistance*, v. 8, p. 129–145, 2015.
- 1110 SANCHEZ ELUCHANS, Nahuel *et al.* *Corynebacterium kroppenstedtii* breast infections:  
 1111 Report of four cases. *Revista Argentina de Microbiologia*, n. xxxx, 2021. Disponível em:  
 1112 <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.002>>.
- 1113 SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, J. *et al.* In vitro activity of newer antibiotics against  
 1114 *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium urealyticum*.  
 1115 *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 22, n. 5, p. 492–496, 2003.
- 1116 SANTOS, Carolina S. *et al.* Efficient differentiation of *Corynebacterium striatum*,  
 1117 *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium xerosis* clinical isolates by multiplex  
 1118 PCR using novel species-specific primers. *Journal of Microbiological Methods*, v. 142, n.  
 1119 September, p. 33–35, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.09.002>>.
- 1120 SATO, Kota; UCHIYAMA, Michihiro. <em>*Corynebacterium jeikeium*
 1121 bacteraemia and pulmonary infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. *BMJ*  
 1122 *Case Reports*, v. 2012, p. bcr1120115097, 20 mar. 2012. Disponível em:  
 1123 <<http://casereports.bmj.com/content/2012/bcr.11.2011.5097.abstract>>.

- 1124 SCHEUTZ, Flemming *et al.* Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for  
1125 subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical*  
1126 *Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 2951–2963, 2012.
- 1127 SCHLEIFER, Karl Heinz. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future.  
1128 *Systematic and Applied Microbiology*, v. 32, n. 8, p. 533–542, 2009. Disponível em:  
1129 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.002>>.
- 1130 SCHOEN, Christoph *et al.* Life-threatening infection caused by daptomycin-resistant  
1131 *Corynebacterium jeikeium* in a neutropenic patient. *Journal of clinical microbiology*, v. 47,  
1132 n. 7, p. 2328–2331, jul. 2009.
- 1133 SENGUPTA, Mallika *et al.* *Corynebacterium amycolatum*: An unexpected pathogen in the  
1134 ear. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 12, p. 10–12, 2015.
- 1135 SENTAUSA, E.; FOURNIER, P. E. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic  
1136 taxonomy. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, n. 9, p. 790–795, 2013. Disponível em:  
1137 <<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12181>>.
- 1138 SHANMUGAM, Lakshmi *et al.* A Rare Case Report of Non-toxigenic *Corynebacterium*  
1139 *diphtheriae* Bloodstream Infection in an Uncontrolled Diabetic With Peripheral Vascular  
1140 Disease. *Cureus*, v. 13, n. 5, 2021.
- 1141 SHARIFF, Malini; ADITI; BERI, Kiran. *Corynebacterium striatum*: An emerging respiratory  
1142 pathogen. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 12, n. 7, p. 581–586, 2018.
- 1143 SHARMA, Naresh Chand *et al.* Diphtheria. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 5, n. 1, 2019.
- 1144 SHIN, Ji Young *et al.* Postoperative Abdominal Infection Caused by *Corynebacterium*  
1145 *minutissimum*. *Infection & chemotherapy*, v. 46, n. 4, p. 261–263, dez. 2014.
- 1146 SHU, Si Yun *et al.* A New Neural Pathway from the Ventral *Striatum* to the Nucleus Basalis  
1147 of Meynert with Functional Implication to Learning and Memory. *Molecular neurobiology*,  
1148 v. 56, n. 10, p. 7222–7233, out. 2019.

- 1149 SIMÕES E SILVA, Ana Cristina; OLIVEIRA, Eduardo A; MAK, Robert H. Urinary tract  
1150 infection in pediatrics: an overview. *Jornal de pediatria*, v. 96 Suppl 1, p. 65–79, 2020.
- 1151 SIMPSON-LOUREDO, Liliane *et al.* *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and  
1152 dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. *Antonie*  
1153 *van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 2, p. 343–352, fev. 2014.
- 1154 SOKOL-LESZCZYNSKA, Beata *et al.* *Corynebacterium coyleae* as potential urinary tract  
1155 pathogen. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 38, n. 7, p.  
1156 1339–1342, 2019.
- 1157 SORIANO, F.; TAUCH, A. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium*  
1158 *urealyticum*: Urinary tract stones and genomics as the Rosetta Stone. *Clinical Microbiology*  
1159 *and Infection*, v. 14, n. 7, p. 632–643, 2008.
- 1160 SORIANO, Francisco *et al.* In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and  
1161 erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *Journal*  
1162 *of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, n. 2, p. 353–356, 2009.
- 1163 SOUZA, Cassius De *et al.* Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards  
1164 *Caenorhabditis elegans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 112, n. 9, p. 1331–1340, set. 2019.
- 1165 STACKEBRANDT, E; GOEBEL, B M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA  
1166 Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in  
1167 Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 44, n. 4,  
1168 p. 846–849, 1994. Disponível em:  
1169 <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-44-4-846>>.
- 1170 STACKEBRANDT, Erko; JONAS, Ebers. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold  
1171 standards. *Microbiology Today*, v. 33, p. 152–155, 2006. Disponível em:  
1172 <[https://www.semanticscholar.org/paper/Taxonomic-parameters-revisited-%3A-tarnished-](https://www.semanticscholar.org/paper/Taxonomic-parameters-revisited-%3A-tarnished-gold-)  
1173 [gold-](https://www.semanticscholar.org/paper/Taxonomic-parameters-revisited-%3A-tarnished-gold-)

- Stackebrandt/50b6c2ffe163a091511d9e857a1ce334184c7655%0Ahttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Taxonomic+parameters+revisited:+tarnished+gold+st>.
- STAPLETON, Ann E. The Vaginal Microbiota and Urinary Tract Infection. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 6, dez. 2016.
- STEFANÍSKA, I *et al.* Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish journal of veterinary sciences*, v. 13, n. 1, p. 143–149, 2010.
- SUPERTI, Silvana Vargas *et al.* *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: The emergence of an opportunistic pathogen. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 51, n. 2, p. 115–116, 2009.
- SZEMRAJ, Magdalena; KWASZEWSKA, Anna; SZEWCZYK, Eligia M. New Gene Responsible for Resistance of Clinical *Corynebacteria* to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B. *Polish journal of microbiology*, v. 67, n. 2, p. 237–240, jun. 2018.
- TAGUCHI, Masashi *et al.* Pancreatic abscess caused by *Corynebacterium coyleae* mimicking malignant neoplasm. *Pancreas*, v. 33, n. 4, p. 425–429, nov. 2006.
- TANG, Lin. Taxonomy of Bacteria and Archaea. *Nature methods*, v. 17, n. 6, p. 562, jun. 2020.
- TEJEDOR-JUNCO, M T *et al.* Isolation of nitrate-reductase positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* from dromedary camels. *Tropical animal health and production*, v. 40, n. 3, p. 165–167, abr. 2008.
- THEEL, Elitza S. *et al.* Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 3093–3095, 2012.

- 1199 THOMPSON, Cristiane C *et al.* *Microbial genomic taxonomy. BMC genomics*. [S.l: s.n.], ,  
 1200 dez. 2013
- 1201 THOMPSON, J D *et al.* The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple  
 1202 sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 24, p.  
 1203 4876–4882, dez. 1997.
- 1204 TINDALL, B J *et al.* Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic  
 1205 purposes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. Pt 1, p.  
 1206 249–266, jan. 2010.
- 1207 TIWARI, Tejpratap S.P. *et al.* Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to  
 1208 toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 3, p. 395–401,  
 1209 2008.
- 1210 TON-THAT, Hung; SCHNEEWIND, Olaf. Assembly of pili on the surface of  
 1211 *Corynebacterium diphtheriae*. *Molecular microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1429–1438, nov. 2003.
- 1212 TORIBIO, J. Alvaro; MARRODÁN, Teresa; FERNÁNDEZ-NATAL, Isabel. Orbital implant  
 1213 infection by *Corynebacterium amycolatum*. *Orbit (London)*, v. 36, n. 5, p. 344–346, 2017.  
 1214 Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01676830.2017.1337172>>.
- 1215 TORRES, Luciene de Fátima Costa *et al.* Multiplex polymerase chain reaction to identify and  
 1216 determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview  
 1217 of human and animal infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 272–  
 1218 279, 2013.
- 1219 TROST, Eva *et al.* Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans*  
 1220 genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC genomics*, v. 12, p. 383, jul.  
 1221 2011.
- 1222 TROST, Eva; GÖTKER, Susanne; *et al.* Complete genome sequence and lifestyle of black-  
 1223 pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1)

- 1224 isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics*, v. 11,  
 1225 n. 1, p. 1–16, 2010.
- 1226 TROST, Eva *et al.* Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights  
 1227 into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria,  
 1228 endocarditis, and pneumonia. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 12, p. 3199–3215, 2012.
- 1229 TROST, Eva; OTT, Lisa; *et al.* The complete genome sequence of *Corynebacterium*  
 1230 *pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis  
 1231 reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, v.  
 1232 11, n. 1, 2010.
- 1233 VAN DAM, A P *et al.* [A case of diphtheria in the Netherlands due to an infection with  
 1234 *Corynebacterium ulcerans*]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, v. 147, n. 9, p. 403–  
 1235 406, mar. 2003.
- 1236 VARGHESE, Neha J. *et al.* Microbial species delineation using whole genome sequences.  
 1237 *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 14, p. 6761–6771, 2015.
- 1238 WAGNER, K. S. *et al.* Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of  
 1239 *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiology and Infection*, v. 138, n. 11, p. 1519–1530, 2010.
- 1240 WAGNER, Karen S. *et al.* Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000–2009.  
 1241 *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 2, p. 217–225, fev. 2012.
- 1242 WANG, Junrui *et al.* Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*  
 1243 among susceptible patients in a tertiary hospital in China. *Journal of infection in developing*  
 1244 *countries*, v. 10, n. 12, p. 1299–1305, dez. 2016.
- 1245 WANG, X *et al.* Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of  
 1246 China: an emerging national nosocomial epidemic. *The Journal of hospital infection*, v. 110,  
 1247 p. 67–75, abr. 2021.
- 1248 WAUTERS, G. *et al.* Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic

- 1249 fermentative corynebacteria of human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 5, p.  
1250 1430–1432, 1998.
- 1251 WAYNE, L G. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the  
1252 report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics.  
1253 *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology,*  
1254 *infectious diseases, virology, parasitology*, v. 268, n. 4, p. 433–434, jun. 1988.
- 1255 WEERASEKERA, Dulanthi *et al.* Beyond diphtheria toxin: Cytotoxic proteins of  
1256 *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (United*  
1257 *Kingdom)*, v. 165, n. 8, p. 876–890, 2019.
- 1258 WOESE, Carl R; FOX, George E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The  
1259 primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 11, p. 5088 LP  
1260 – 5090, 1 nov. 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/74/11/5088.abstract>>.
- 1261 YANAGAWA, R; HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites and  
1262 pathogens of the genus *Corynebacterium*. *Infection and immunity*, v. 13, n. 4, p. 1293–1295,  
1263 abr. 1976.
- 1264 YASSIN, A. F.; STEINER, U.; LUDWIG, W. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and  
1265 emended description of *Corynebacterium minutissimum* collins and Jones (1983).  
1266 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 1001–  
1267 1005, 2002.
- 1268 YOON, Seok-Hwan *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S  
1269 rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and*  
1270 *evolutionary microbiology*, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, maio 2017.
- 1271 YOON, Seoyoung *et al.* Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel  
1272 mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean Journal of*  
1273 *Laboratory Medicine*, v. 31, n. 1, p. 47–48, 2011.

- 1274 ZAKIKHANY, K; NEAL, S; EFSTRATIOU, A. Emergence and molecular characterisation  
 1275 of non-toxicogenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United  
 1276 Kingdom, 2003-2012. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles*  
 1277 = *European communicable disease bulletin*, v. 19, n. 22, jun. 2014.
- 1278 ZAKIKHANY, Katherina; EFSTRATIOU, Androulla. *Diphtheria in Europe: Current*  
 1279 *problems and new challenges. Future Microbiology*. [S.l.]: Future Microbiol. , maio 2012
- 1280 ZASADA, A A; MOSIEJ, E. Contemporary microbiology and identification of  
 1281 *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Letters in applied microbiology*, v. 66, n. 6,  
 1282 p. 472–483, jun. 2018.
- 1283 ZASADA, Aleksandra Anna; FORMIŃSKA, Kamila; RZECZKOWSKA, Magdalena.  
 1284 [Occurrence of pili genes in *Corynebacterium diphtheriae* strains]. *Medycyna doświadczalna i*  
 1285 *mikrobiologia*, v. 64, n. 1, p. 19–27, 2012.

1286

1287 **Figure Legends**

1288

1289 **Figure 1.** Phylogenetic tree showing position of the *Corynebacterium hiratae* sp. nov. against  
 1290 the most closely related type strains of *Corynebacterium* genus based on 16S rRNA gene  
 1291 sequences. GenBank accession numbers of 16S rRNA are indicated in parentheses. Alignment  
 1292 was performed with sequences (1442-1525 bp) of the 16S rRNA gene. The inferred distance  
 1293 was calculated using the Kimura-2 parameters model. Bootstrap values (> 60%) based on  
 1294 1.000 repetitions are shown. The sequence of *Acidimicrobium ferrooxidans* DSM 10331<sup>T</sup> was  
 1295 used as outgroup. Bar 0.020 % estimated sequence divergence.

1296

1297 **Figure 2.** Phylogenetic tree showing the position of the *Corynebacterium hiratae* sp. nov.  
 1298 against to the most closely related type strains of *Corynebacterium* genus based on *rpoB* gene

sequences. GenBank accession numbers of *rpoB* are indicated in parentheses. Alignment was performed with partial sequence (419 bp) of the *rpoB* gene. The inferred distance was calculated using the Kimura-2 parameters model. Bootstrap values (> 60%) based on 1,000 repetitions are shown. The sequence of *Actinopolyspora halophila* DSM 43834<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar 0.10 % estimated sequence divergence.

**Figure 3.** Phylogenetic tree based on the MLSA approach showing the position of *Corynebacterium hiratae* sp. nov. against the most closely related strains of *Corynebacterium* genus based on the sequences of seven housekeeping genes (*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* and *rpoB*). The GenBank access numbers for the respective genomes are indicated in parentheses. Bootstrap values (> 60 %) are shown based on 1,000 repetitions. The strain type *Actinopolyspora halophila* DSM 43834<sup>T</sup> was used as outgroup. Bar 0.10 % estimated sequence divergence.

**Figure 4.** Phylotaxonomic genome tree showing the position of the *Corynebacterium hiratae* sp. nov. against to the most closely related type strains of *Corynebacterium* genus based on whole genome sequences. The genomic sequences were analyzed by Type (Strain) Genome Server (TYGS) with standard parameters. Tree inferred with FastME 2.1.6.1 from GBDP distances calculated from genome sequences. The branch lengths are scaled in terms of GBDP distance formula d5. The numbers above branches are GBDP pseudo-bootstrap support values > 60 % from 100 replications, with an average branch support of 84.9 %.

Table 1

**Table 1. Biochemical profile by API® Coryne from Brazilian *Corynebacterium hiratae* sp. nov., *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, and *Corynebacterium aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> strains.**

| Biochemical characteristics | 2274                                                | ATCC 700975                                                | DSM 44532 <sup>T</sup>                                          |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Nitrate reductase           | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Pyrazinamidase              | +                                                   | -                                                          | +                                                               |
| Pyr*                        | +                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Alkaline phosphatase        | +                                                   | -                                                          | +                                                               |
| β-gur*                      | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| β-gal*                      | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| α-glu*                      | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| β-NAG*                      | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Esculin                     | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Urease                      | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Gelatin hydrolyse           | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Oxidase                     | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Glucose                     | +                                                   | +                                                          | +                                                               |
| Ribose                      | +                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Xylose                      | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Mannitol                    | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Maltose                     | +                                                   | +                                                          | +                                                               |
| Lactose                     | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Sucrose                     | +                                                   | -                                                          | +                                                               |
| Glycogen                    | -                                                   | -                                                          | -                                                               |
| Catalase                    | +                                                   | +                                                          | +                                                               |
| Result                      | <i>Corynebacterium</i><br><i>group G</i><br>(94.3%) | <i>Corynebacterium</i><br><i>argenteratense</i><br>(43.2%) | <i>Corynebacterium</i><br><i>striatum/amycolatum</i><br>(96.0%) |

\*Pyr: pyrrolindonilarilamidase; β-gur: β-glucuronidase; β-gal: β-galactosidase; α-glu: α-glucosidase; β-NAG: β-glucosaminidase.

Table 2

**Table 2. Clinical aspects of six strains of *Corynebacterium hiratae* sp. nov. isolated from Brazil.**

| Strain | Date   | Clinical aspects |                |                       | Microbiological identification |                                              |                                                      |
|--------|--------|------------------|----------------|-----------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|        |        | Age / Gender     | Origin samples | Underlying conditions | Conventional                   | MALDI-TOF (score*)                           | 16S rRNA <sup>a</sup> / <i>rpoB</i> <sup>b</sup> (%) |
| 2274   | May/11 | 54/Female        | Urine          | Kidney disease        | <i>Corynebacterium</i> sp.     | <i>Corynebacterium</i> group G (2.025/1.700) | <i>C. aurimucosum</i> <sup>c</sup> (99.73/97.85)     |

<sup>a</sup>Analysis performed with complete sequence of the 16S rRNA gene of 1517 bp.

<sup>b</sup>Analysis performed with partial sequence of the *rpoB* gene of 419 bp.

<sup>c</sup>*C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>.

Figure 1

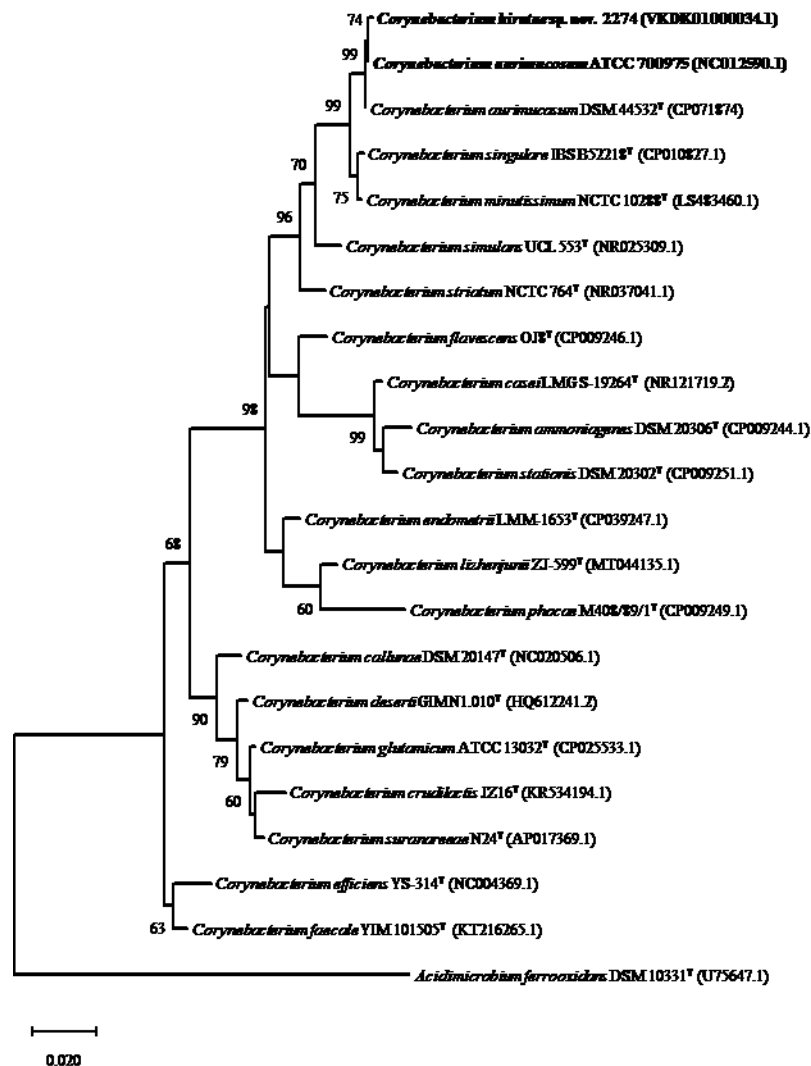


Figure 2

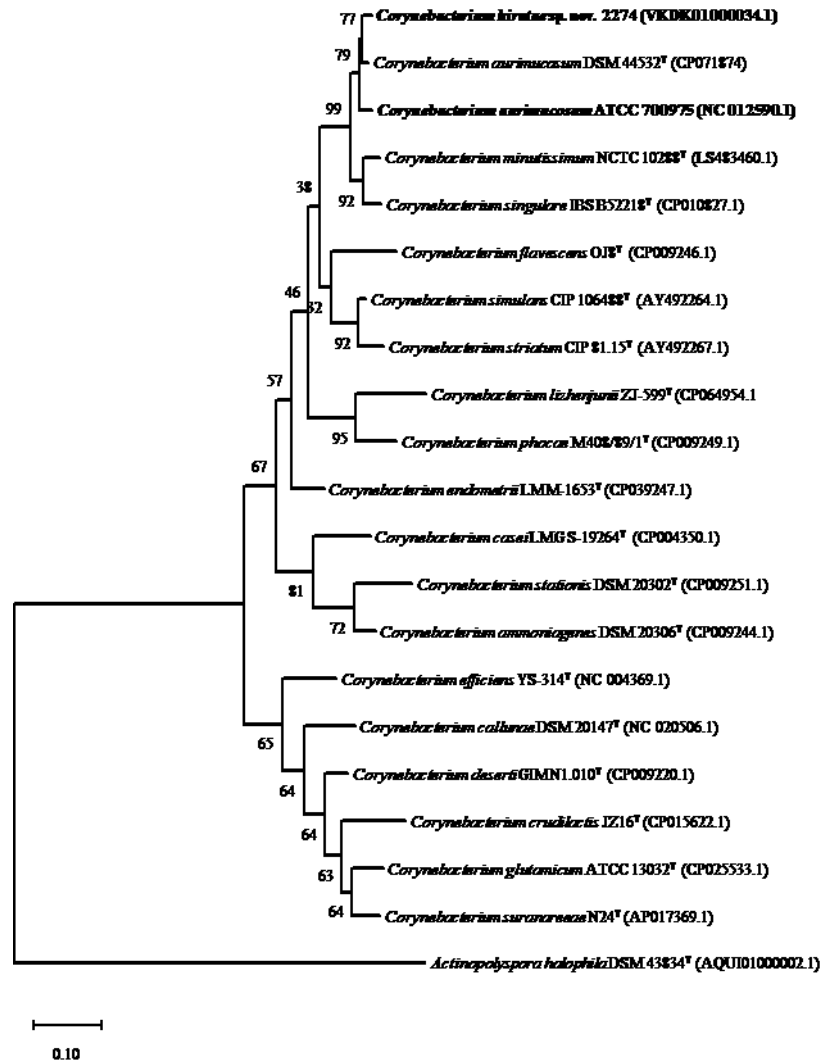
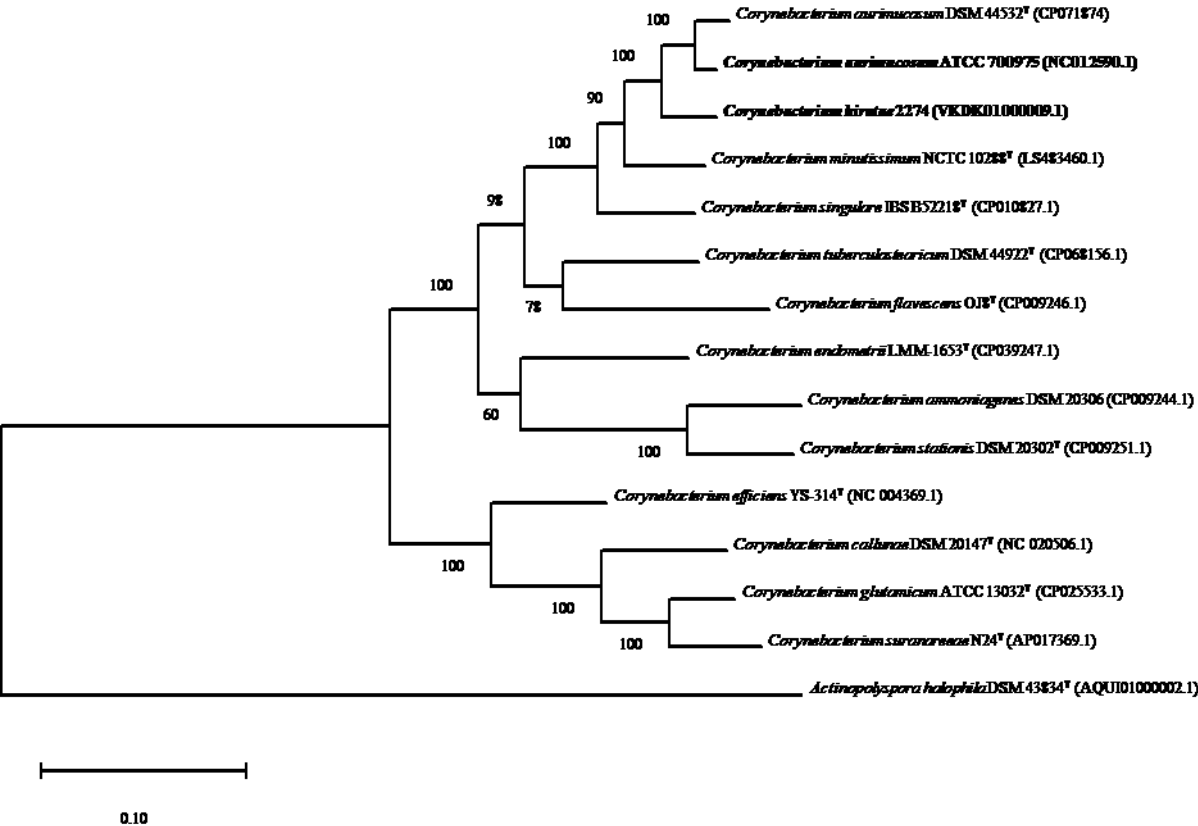


Figure 3



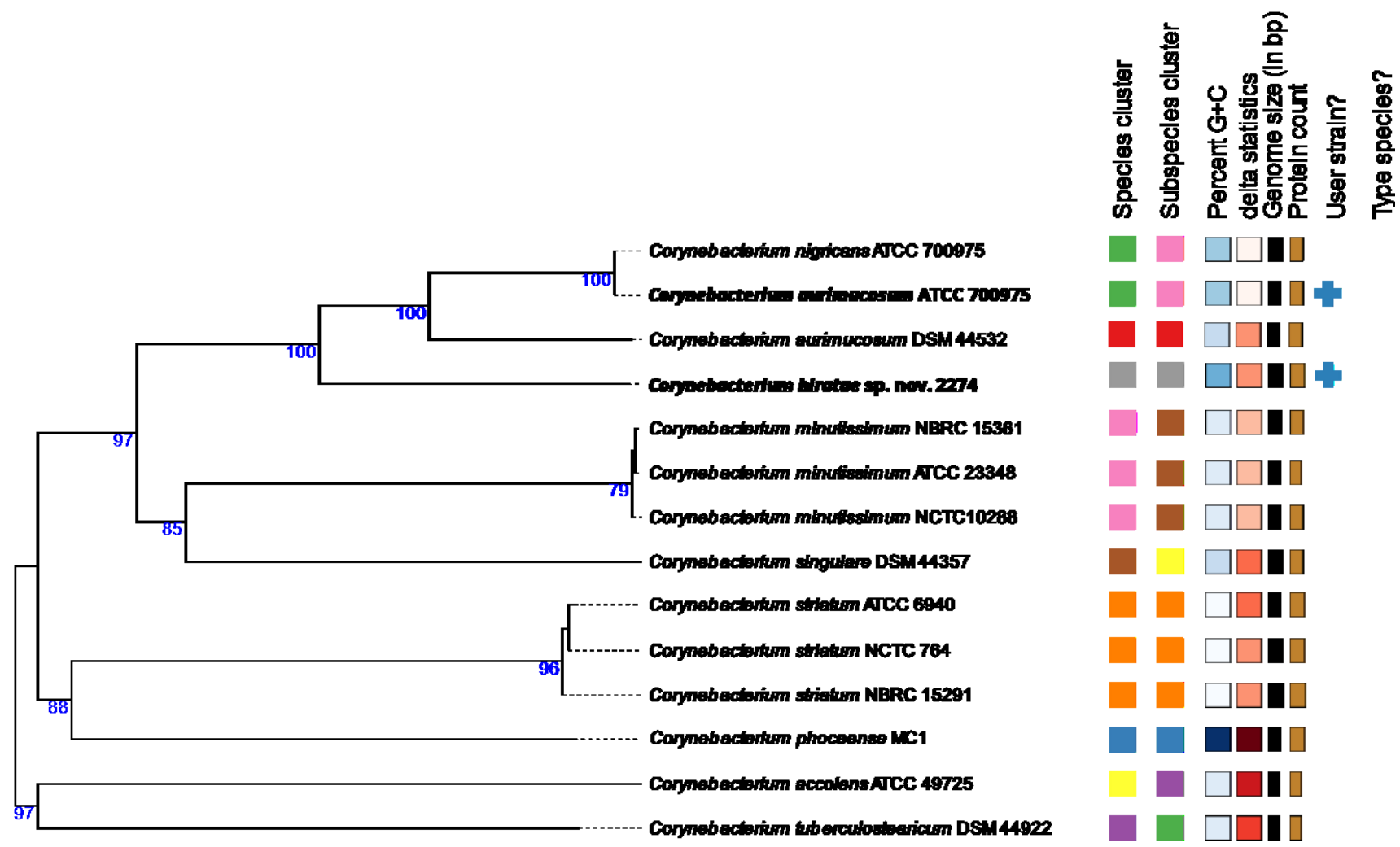
**Table 3**

**Table 3. Comparison values of *Corynebacterium hiratae* sp. nov. strains sequenced, assembled, and annotated and *C. aurimucosum* ATCC 700975 with the type strain *C. aurimucosum* DSM 44532.**

| Characteristics                      | 2274         | ATCC 700975  | DSM 44532 <sup>T</sup> |
|--------------------------------------|--------------|--------------|------------------------|
| Accession number                     | VKDK00000000 | NC012590.0.1 | CP071874               |
| Estimated genome size (bp)           | 2.865.662    | 2.790.189    | 2.683.665              |
| G+C content (%)                      | 61.1         | 60.6         | 60.5                   |
| Number of contigs                    | 85           | 1            | 1                      |
| Median sequence size (bp)            | 2438         | 2.790.189    | 2.683.665              |
| N50                                  | 85002        | 0            | 0                      |
| L50                                  | 9            | 1            | 1                      |
| Number of CDSs                       | 2860         | 2665         | 2572                   |
| Number of RNA genes                  | 60           | 64           | 57                     |
| Proteins with functional assignments | 1727         | 1604         | 1581                   |
| Hypothetical proteins                | 1133         | 1061         | 991                    |

bp, base pair; CDS, Coding sequence; RNA, Ribonucleic acid;

Figure 4



### **3.3 Artigo 3: Potencial de virulência da primeira amostra de *Corynebacterium mycetoides* de urina humana: uma espécie rara de *Corynebacterium*.**

Por muitos anos, o potencial patogênico de corinebactérias não diftéricas foi subestimado. Atualmente, um número crescente de espécies de *Corynebacterium* são reconhecidas como agentes oportunistas de infecções humanas, principalmente em ambientes hospitalares. Além disso, isolados de *Corynebacterium* MDR a partir de amostras clínicas foram relatados e o papel de *Corynebacterium* spp. em infecções do trato urinário (ITU) tem sido destacado. Vários estudos relataram espécies de *Corynebacterium* como o agente de ITU, especialmente em pacientes com fatores de risco. Assim, o presente trabalho teve como objetivo relatar o primeiro isolamento de *Corynebacterium mycetoides* de urina humana e um estudo inicial sobre suas propriedades de virulência. O isolado, inicialmente caracterizado por testes fenotípicos como *Corynebacterium* sp. multirresistente, foi recuperado da urina de uma paciente transplantada. A espectrometria de massa e o sequenciamento dos genes do sistema 16S rRNA e *rpoB* identificaram o isolado como *C. mycetoides*. O isolado foi capaz de aderir e sobreviver em células epiteliais (células Vero), e seu potencial patogênico foi confirmado quando testado contra o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Os resultados obtidos sugerem que *C. mycetoides* é um potencial patógeno para o trato urinário em humanos e para um melhor entendimento dos mecanismos multifatoriais de virulência, estudos sobre esta espécie devem ser continuados.

**Title Page**

**Virulence potential of the first *Corynebacterium mycetoides* strain isolated from human urine: a rare species of *Corynebacterium***

**Lincoln de Oliveira Sant'Anna<sup>a\*</sup>, Elisabete Alves Cappelli<sup>a</sup>, Max Roberto Batista Araújo<sup>b</sup>, Juliana Nunes Ramos<sup>a</sup>, Liliane Simpson-Lourêdo<sup>a</sup>, Andrezza do Espirito Santo Cucinelli<sup>a</sup>, Paulo Victor Pereira Baio<sup>c</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>d</sup>; Louisy Sanches dos Santos<sup>a</sup>, Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, State University of Rio de Janeiro.

Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, 3º andar, Vila Isabel, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>b</sup>Hermes Pardini Institute.

Av. das Nações, 2448, Santo Antônio, 33200-000, Vespasiano, MG, Brazil.

<sup>c</sup>Army Chemical and Pharmaceutical Laboratory, Ministry of Defense.

R. Licínio Cardoso, 96, São Francisco Xavier, 20960-015, Rio de Janeiro - RJ, Brazil.

<sup>d</sup>Interdisciplinary Laboratory of Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation.

Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[lincolnsantana2013@gmail.com](mailto:lincolnsantana2013@gmail.com) \*Correspondence and reprints.

[b.cappelli@hotmail.com](mailto:b.cappelli@hotmail.com)

[max\\_barau@hotmail.com](mailto:max_barau@hotmail.com)

[jnr.uerj@gmail.com](mailto:jnr.uerj@gmail.com)

26 [liliane.uerj@gmail.com](mailto:liliane.uerj@gmail.com)

27 [andrezacucinelli@yahoo.com.br](mailto:andrezacucinelli@yahoo.com.br)

28 [pvpbaio@gmail.com](mailto:pvpbaio@gmail.com)

29 [louisysanchesuerj@gmail.com](mailto:louisysanchesuerj@gmail.com)

30 [vieira@ioc.fiocruz.br](mailto:vieira@ioc.fiocruz.br)

31 [ana.guaraldi@uerj.br](mailto:ana.guaraldi@uerj.br)

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

## Abstract

For many years, the potential pathogenic of non-diphtheriae corynebacteria were underestimated. Nowadays, a growing number of *Corynebacterium* species are recognized as opportunistic agents of human infections, mainly in hospital settings. In addition, multidrug-resistant *Corynebacterium* isolates from clinical specimens, have been reported and the role of *Corynebacterium* spp. in urinary tract infections (UTIs) has been highlighted. Several studies have reported *Corynebacterium* species as the agent of UTIs especially in patients with risk factors. Thus, the present work aimed to report the first isolation of *Corynebacterium mycetoides* from human urine and an initial study on its virulence properties. The isolate, initially characterized by phenotypical tests as a multidrug-resistant *Corynebacterium* sp., was recovered from the urine of a female transplant patient. Mass spectrometry and system 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing identified the isolate as *C. mycetoides*. The isolate was found able to adhere to and survive into epithelial cells (Vero cells), and its pathogenic potential was confirmed when tested against *Caenorhabditis elegans* nematode. The results obtained suggest that *C. mycetoides* is a potential pathogen for the urinary tract in humans and for a better understanding of the multifactorial mechanisms of virulence, studies about this species should be continued.

**Keywords:** *Corynebacterium mycetoides*; multidrug resistance; urinary tract infection; bacterial infections

## Introduction

*Corynebacterium* species are ubiquitous in the environment and can be found as a constituent of the skin and mucous microbiota of humans and animals (CRESCI *et al.*, 2016). Several species of corynebacteria are involved in different pathological processes both animal and human hosts (RUIZ-PINO *et al.*, 2019). *Corynebacterium* genus belongs to the *Actinobacteria* class and comprises a collection of aerobically growing, non-acid-fast, non-sporogenous, irregular rod-shaped microorganisms with a high G + C content (BERNARD, KATHRYN A.; FUNKE, 2015).

For many years, the potential pathogenic of corynebacteria, other than *Corynebacterium diphtheriae*, was underestimated. Only in the 1990s, both clinical microbiologists and physicians became more aware of the great diversity of corynebacteria species associated with human diseases (FUNKE, G *et al.*, 1997). Nowadays, several *Corynebacterium* species are recognized as opportunistic agents of human infections, including in nosocomial infections (SAKHI *et al.*, 2021; SOKOL-LESZCZYNSKA *et al.*, 2019). In addition, the increased number of reports on multidrug-resistant (MDR) *Corynebacterium* isolates from clinical specimens, has been a concern cause (BAIO *et al.*, 2013; SENGUPTA *et al.*, 2015).

Although formerly considered contaminants, several studies have reported *Corynebacterium* species, including *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium phoceense*, *Corynebacterium coyleae*, and *Corynebacterium aurimucosum* as the agents of UTIs, especially in patients with risk factors (BARBERIS, CLAUDIA M. *et al.*, 2021; LEFÈVRE *et al.*, 2021; SAKHI *et al.*, 2021; SOKOL-LESZCZYNSKA *et al.*, 2019).

Microbiological diagnosis of *Corynebacterium* spp. remains a challenge (ZASADA, A A; MOSIEJ, 2018). In the last decade, with the advent and establishment of mass

spectrometry with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) in the routine of clinical laboratories, the microorganism's identification became more reliable and less laborious. The clinical spectrum of emerging pathogens has become broader, then, the identification of uncommon species has become more frequent (PICHON *et al.*, 2019; RYCHERT, 2019).

The present study reports the first *Corynebacterium mycetoides* isolation from human urine, a rare *Corynebacterium* species that has not been reported since the final '40s. Additionally, we present a study on the virulence properties associated with the establishment of *C. mycetoides* infections.

## 1. Material and Methods

### 2.1 Origin of bacterial isolate

The isolate, initially identified as *Corynebacterium* sp. was recovered from the urine of a transplant patient, female, 57 years old, with a history of recurrent UTI by several microorganisms, including *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Corynebacterium afermentans*, and others unidentified Irregular Gram-positive Rods (IGPR) isolated from pure cultures. At the time of the urine collection, the patient was in immunosuppressive therapy with cyclosporine and had been diagnosed with a hepatitis C virus infection.

### 2.2 Bacterial isolation, culture conditions, and phenotypic identification

The isolate obtained in pure culture ( $1.0 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>) from a medium-flow urine sample grown on Cystine Lactose Electrolyte-Deficient agar (Merck, Darmstadt, Germany) was initially screened based on Gram stain, colonial morphology, pigment production,

hemolysis, and catalase production. The isolate was seeded in Tryptone Soya Agar (TSA; Thermo Scientific™, United Kingdom) and after incubation at 37 °C for 48 h, it was submitted to conventional phenotypic identification as described by Bernard and Funke (FUNKE, G *et al.*, 1997). Furthermore, the semi-automated commercially available API® Coryne (bioMérieux, France), was used according to the manufacturer's guidelines for secondary identification.

### 2.3 Molecular identification and phylogenetic analysis

The molecular identification of the isolated was carried out using MALDI-TOF (Microflex®, Bruker Daltonics, France) as previously described by Theel and collaborators (THEEL *et al.*, 2012), and through 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing analysis. Therefore, genomic DNA was extracted following the thermal lysis protocol as described by Baio and collaborators (BAIO *et al.*, 2013). Subsequently, the amplification of 16S rRNA and *rpoB* genes were performed according to protocols previously described (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004; KHAMIS; RAOULT; SCOLA, 2005). Sequencing reactions were performed using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Foster City, USA) following standard protocols. The 16S rRNA gene sequence was compared to type strains sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm and the EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) server (YOON, SEOK-HWAN *et al.*, 2017). The *rpoB* gene sequence was compared to type strains sequences only in the NCBI using the BLAST algorithm. ClustalX2 and MegaX were used to perform the alignment and construction of the phylogenetic trees of each gene, respectively (KUMAR *et al.*, 2018; THOMPSON, J D *et al.*, 1997). The evolutionary history was inferred by using the

Maximum Likelihood (ML) method and the Kimura 2-parameter model (KIMURA, M, 1980).

#### 2.4 Antimicrobial susceptibility testing

The sensitivity to antimicrobial agents was determined by the disk diffusion method according to Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) breakpoints (BRCAST, 2021). Multidrug-resistant (MDR) profile was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial classes (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

#### 2.5 Origin of bacterial strains for virulence assays

In vitro assays were performed using *Corynebacterium diphtheriae* TR241, *Corynebacterium ulcerans* BR-AD22, *Corynebacterium mycetoides* 2450 and *Corynebacterium diphtheriae* CDC E-8392. Additionally, *Escherichia coli* strain OP50 was used. *C. mycetoides* 2450 has been deposited in the Collection of Bacteria from Environment and Health of Oswaldo Cruz Foundation (CBAS/FIOCRUZ) under the number CBAS 817.

#### 2.6 Biofilm formation on glass and polystyrene surfaces

Biofilm formation test was carried out according to previously described by Mattos-Guaraldi and Formiga (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991). The procedure was performed in triplicate and repeated three times. *C. diphtheriae* CDC-E8392 and TR241 strains were used as negative and positive control strains, respectively.

Semi-quantitative adherence assays in 96-well polystyrene microtiter plates were performed as previously described (GOMES *et al.*, 2009). Each assay was performed in triplicate and repeated three times. For positive and negative controls, the *C. diphtheriae* CDC

E-8392 and pure Tryptic Soy Broth were used, respectively.

## 2.7 Biofilm formation on catheter surfaces

Biofilm formation in catheters and semi-quantitative roll-plate technique was performed using polyurethane 16-gauge percutaneous nephrostomy catheter (Intracath; Deseret Pharmaceutical Co., Utah) to assess bacterial adhesion and biofilm formation on their surfaces as previously described (GOMES *et al.*, 2009; MAKI; WEISE; SARAFIN, 1977). An adaptation following the same protocol mentioned above-using silicone and latex 16 French two-way Foley catheter (Teleflex®, North Carolina) was performed. Each assay was performed in triplicate and repeated three times.

## 2.8 Vero cells interaction assays

Cellular interaction assays were performed using Vero epithelial cell lineage (ATCC® CCL-81™), derived from the normal kidney of African green monkey, as previously described by Hirata Jr. and collaborators (HIRATA, RAPHAEL *et al.*, 2002). For each period of incubation examined (1, 2, 3, 4, and 6 h), supernatants and cell lysates were diluted and plated onto TSA to determine the number of viable associated and internalized bacteria (CFU.mL<sup>-1</sup>). Assays were performed in triplicates and repeated three times. The *p*-value was determined by the two-way ANOVA analysis of variance. Data were considered statistically different when *p*-<0.05.

## 2.9 Caenorhabditis elegans nematode infection model

The nematode killing assay was performed based on protocols previously described (ANTUNES *et al.*, 2015). For negative control, *Escherichia coli* OP50 was used. In parallel, physiological and/or morphological changes (worm bagging effect) in adult and larval stage

worms were analyzed. Statistics analyses were performed with GraphPad Prism 9.0, using the Kaplan-Meier survival analysis, and considering  $p$ -values of less than 0.05 as significant. To investigate the ability to form worm-star, worms were exposed to bacterial strains in M9 buffer according to methods adapted from previous studies (ANTUNES *et al.*, 2016). For positive and negative controls *C. ulcerans* BR-AD22 and *Escherichia coli* OP50 were used, respectively. All experiments were performed in triplicate for each sample.

## 2.10 Data deposition

The accession numbers of 16S rRNA and *rpoB* genes sequences of *C. mycetoides* 2450 isolate included in this study were deposited at GenBank Database under the following access numbers: OL314259 and OL361859, respectively.

## 2. Results

### 3.1 Phenotypic identification

After the incubation period, an abundant growth was observed in the culture medium, characterized by the presence of non-hemolytic colonies, bright dark yellow-pigmented, and mucoid in appearance, measuring about 1-2 mm in diameter (Fig. 1A). Although the isolate presented unusual colonial aspects for corynebacteria, the microscopic analysis showed Gram-positive, cocco-bacillary, and claviform microorganisms of different sizes, compatible with IGPR (Fig. 1B). As displayed in Table 1, it was not possible to determine the species through conventional phenotypic identification methods, being the isolate identified as *Corynebacterium* spp. In contrast to conventional phenotypic identification, the commercial API Coryne system identified the isolate as *Corynebacterium argensoratense* (biocode 2100104; 80%).

### 3.2 Molecular identification and phylogenetic analysis

Results presented in Table 1 showed that the MALDI-TOF mass spectrometry technique was able to identify the isolate as *Corynebacterium mycetoides* with a safe score for genus identification and possible identification for species (2.214). Likewise, the 16S rRNA gene sequence (1500 bp) analysis obtained through the NCBI and EzBioCloud allowed the identification of the isolate at the species level as *C. mycetoides* with similarity values of 99.93% and 100%, respectively. The similarity value obtained by the analysis of the *rpoB* gene sequence (432 bp) was also identified as belonging to the same species with a value of 99.54 %.

Phylogenetic analysis using the 16S rRNA gene from *C. mycetoides* 2450 with the most closely related species revealed a uniform clustering of the isolate with *C. mycetoides* DSM 20632<sup>T</sup> (Fig. 2). Likewise, the phylogeny of the *rpoB* gene with the most related species also confirmed the grouping of the isolate together with *C. mycetoides* DSM 20632<sup>T</sup>, showing a small phylogenetic distance (Fig. 3).

### 3.3 Antimicrobial susceptibility testing

As observed in Table 1, the clinical isolate *C. mycetoides* showed resistance to benzylpenicillin, clindamycin, and rifampicin, expressing an MDR profile.

### 3.4 Biofilm formation on glass and polystyrene surfaces

As shown in Fig. 4A, no sessile bacteria stained with crystal violet was observed on the glass surface, indicating that the *C. mycetoides* was unable to adhere and produce biofilm on this hydrophilic substrate. Likewise, when measuring OD in a semi-quantitative microtiter plate adherence assay, the clinical isolate was found expressing a non-adherent phenotype (-: OD < OD<sub>c</sub>) on the hydrophobic surface of polystyrene (Fig. 4B).

### 3.5 Biofilm formation on catheter surfaces

Results of semi-quantitative analysis of viable sessile cells of *C. mycetoides* are shown in Fig. 4C. Segments of polyurethane, silicone, and latex catheters were colonized in vitro by *C. mycetoides* isolate. The confluent bacterial growth ( $> 15$  UFC) in the culture medium demonstrated that *C. mycetoides* was able to adhere and multiply extensively along the entire length of the segments of all catheters tested.

### 3.6 Vero cells interaction assays

To evaluate the capacity of *C. mycetoides* to interact with epithelial renal cells, quantitative adherence and internalization assays were performed using Vero cells infected with the clinical isolate at several time points. As observed in Fig. 5A, the clinical strain showed different levels of adherence during the experiment ( $p < 0.05$ ). Similar and small numbers of viable associated bacteria were detected 1 and 2 h post-infection ( $1.43 \pm 0.39 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> and  $1.82 \pm 0.58 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>, respectively). The number of adherent bacteria increased significantly in the periods from 2 to 3 h, 4 to 5 h, and 5 to 6 h post-infection ( $p < 0.05$ ). The highest number of viable associated bacteria ( $9.9 \pm 0.5 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>) was observed at 6 h post-infection ( $p < 0.05$ ). Additionally, viable bacteria were found within Vero cells at all time points with no significant difference (Fig. 5B).

### 3.7 *Caenorhabditis elegans* nematode infection model

In order to evaluate the harmful effects of colonization of *C. elegans* by *C. mycetoides*, the current study determined the survival of nematodes after contact with the clinical strain. According to the data presented in Fig. 6A, after 3 days post-infection, it was already possible to observe the death of about 50 % of worms, which increased to about 60 % after 5 days. As expected, 90 % of the worms remained viable after 5 days of contact with *E. coli* OP50 strain

used as control. The ability of *C. mycetoides* to induce internal egg hatching in adult *C. elegans* worms, a phenomenon called “worm bagging”, was also verified. Fig. 6B illustrates morphological changes characteristic of inducing the bagging effect on nematodes infected with *C. mycetoides*. The formation of worm aggregates glued by their tails, known as worm-star formation, are symptoms of surface colonization of *C. elegans* by certain pathogenic bacteria. The ability of *C. mycetoides* to lead to formation of worm-star was also evaluated. Worm clusters were observed after incubation for 2 days in liquid culture in the presence of *C. mycetoides* (data not shown). As expected, worm-stars or bagging effects were not observed during culture with *E. coli* OP50 (data not shown).

### 3. Discussion

Enteric Gram-negative bacteria are the main causative agents of UTI, a serious public health problem worldwide (OUMER *et al.*, 2021). However, Gram-positive microorganisms, such as *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, and some *Corynebacterium* spp. have already been associated with UTI, with the *Corynebacterium* genus belonging to the Diptheroides group, the ninth most frequently isolated group in intensive care units (KLINE; LEWIS, 2016; ROACH *et al.*, 2015).

*Corynebacterium* genus is widely distributed in the environment and is usually found as a constituent of the normal microbiota of the human skin and mucosa. An increasing number of *Corynebacterium* spp. have been increasingly recognized as causative agents of human infections such as endocarditis, respiratory tract infections, and UTIs (ROTH *et al.*, 2020; SHARIFF; ADITI; BERI, 2018; SOKOL-LESZCZYNSKA *et al.*, 2019).

*C. mycetoides* was isolated for the first time in 1942 by Castellani from tropicaloid ulcer cultures affecting soldiers in the desert Africa regions. Over the years, other isolates (n =

5) have been also recovered from tropicaloid ulcers in different parts of the world, such as Central America, Africa, Spain, Portugal, Italy, and the Far East (CAPOCACCIA; ORTALI, 1956).

To the best of our knowledge, we report the first isolation of *C. mycetoides* from human urine recovered from a patient undergoing kidney transplantation using cyclosporine, an immunosuppressive drug. As observed in some studies, transplantation has been described as an important risk factor for UTI due to corynebacteria species, especially under immunocompromised circumstances (LÓPEZ-MEDRANO *et al.*, 2008; ROBERT; ANNA; GRAŻYNA, 2018).

The isolate of *C. mycetoides* in this study has phenotypic characteristics similar to those described in previous studies (CAPOCACCIA; ORTALI, 1956; CAPOCACCIA; ORTALI; CAPONEBRAGA, 1957). The use of traditional phenotypic identification schemes did not allow to identify the isolate at the species level based on conventional identification tables due to the wide variety of species that have closely related phenotypes. Identification of *Corynebacterium* species remains routinely problematic in clinical diagnostic laboratories and most isolates remain identified only at the genus level (ZASADA, A A; MOSIEJ, 2018).

Several identification systems based on biochemical tests have been developed for laboratory diagnosis of *Corynebacterium* infections such as API® Coryne, RapID™ CB Plus, BBL™ Crystal™, VITEK-2, and BD Phoenix System (ZASADA, A A; MOSIEJ, 2018). However, in this study, the use of the API® Coryne erroneously identified the *C. mycetoides* as *C. argentoratense*. Previous studies showed that not all *Corynebacterium* isolates could be identified by commercial systems and several isolates are incorrectly identified (ADDERSON *et al.*, 2008). Identification failures are usually related to the limited number of entries present in the systems databases. For example, rare or newly described species are not always included in an identity matrix of a particular system, or entries are based on a limited number

of type strains. In addition, the phenotype can vary between isolates of a particular species, or insufficient inoculation of the isolate can result in weak biochemical reactions that are difficult to discriminate (ADDERSON *et al.*, 2008; ZASADA, A A; MOSIEJ, 2018). Another common problem with these systems is the difficulty in identifying pigmented microorganisms, especially those with a yellow pigment, such as *C. mycetoides* 2450 isolated in this work (FUNKE, G; PETERS; ARAVENA-ROMAN, 1998).

Presently, mass spectrometry and gene sequencing were also used to identify the clinical isolate. MALDI-TOF MS is a high-throughput technology based on protein profiling, comparing the mass spectrum of the tested organism with reference spectra in databases to find the closest match (CHEAN *et al.*, 2014). This technique has been increasingly used for identifying bacteria in microbiology laboratories. Analysis by MALDI-TOF MS allowed the identification of the clinical isolate as *C. mycetoides* with satisfactory scores. Several studies have reported mass spectrometry as a good tool to identify *Corynebacterium* isolates at the species level, and even those that are uncommon or rare, and difficult to distinguish from closely related species (ALIBI, S *et al.*, 2015; PICHON *et al.*, 2019).

Analysis by 16S rRNA gene sequence is the most widely used tool used to determine phylogenetic relationships of bacteria. However, its objective for taxonomic analysis or species identification has limits due to the low intragenus polymorphism as already observed by Khamis and collaborators, which suggest, for a better analysis that the complete sequence of the 16S rRNA gene should be used, as we performed in this study (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004). Furthermore, even in their study, based on determinations of intragenus polymorphic regions, Khamis and collaborators point out the analysis of the *rpoB* gene as an adjuvant or substitute for the analysis of the 16S rRNA gene, with a more precise identification for *Corynebacterium* spp. (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004; KHAMIS; RAOULT; SCOLA, 2005).

In fact, the identifications obtained by the molecular methodologies used in this study corroborate each other. Both gene similarity analyzes obtained values above the cutoff points suggested by previous studies for the identification of *Corynebacterium* spp., which are 98.7% and 95%, respectively (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004). Furthermore, the results of the molecular identifications are reflected in the phylogenetic analyzes of both genes, which highlight the isolate *C. mycetoides* 2450 in a cluster together with *C. mycetoides* DSM 20632<sup>T</sup>, reaffirming the close relationship with the type strain.

Regarding susceptibility to antimicrobial agents, Mungelluzzi and Caprilli (MUNGELLUZZI; CAPRILLI, 1965) reported a sensitivity of *C. mycetoides* to streptomycin and bacitracin, and intermediate resistance to chloramphenicol, penicillin, and terramycin. In the present work, the *C. mycetoides* isolate exhibited resistance to three antimicrobial agents (benzylpenicillin, clindamycin, and rifampicin), which characterizes it as an MDR isolate according to the criteria proposed by Magiorakos and collaborators (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). Several studies have reported a high prevalence of macrolides and lincosamides resistance among *Corynebacterium* species and highlighted the presence of methylase enzymes encoded by *ermX* class genes as the main mechanisms of macrolide resistance of these microorganisms (RAMOS *et al.*, 2018; SZEMRAJ; KWASZEWSKA; SZEWCZYK, 2018). Conversely, the isolate *C. mycetoides* was sensitive to vancomycin and linezolid, corroborating previous reports that demonstrated 100% susceptibility of corynebacteria isolates to both drugs (SALEM *et al.*, 2015; SOKOL-LESZCZYNSKA *et al.*, 2019). Vancomycin may represent the empirical therapeutic option for serious infections pending the results of susceptibility tests, as vancomycin is the treatment of choice for other multidrug-resistant corynebacteria (SALEM *et al.*, 2015).

Since the first *C. mycetoides* report isolation in 1956, few studies involving this species were published in the literature (CAPOCACCIA; ORTALI, 1956; CAPOCACCIA;

ORTALI; CAPONEBRAGA, 1957; MUNGELLUZZI; CAPRILLI, 1965). However, no one has focused on the mechanisms of virulence of this species. Besides reporting the isolation of *C. mycetoides* from human urine, the present investigation provides insight into mechanisms of virulence accountable to the potential pathogenic of this *Corynebacterium* spp.

Biofilm structures by *Corynebacterium* spp. have been found in various medical devices, such as urinary catheters and central venous catheters, among others (DE SOUZA *et al.*, 2015). The *C. mycetoides* isolate, although incapable of adhering to polystyrene and glass surfaces, was able to adhere significantly to the surfaces of latex, silicone, and polyurethane catheters. Silicone and latex urinary catheters are widely used in hospital practice to aid in the diagnosis and treatment of various pathological processes (LENZ, 2006). Thus, the ability of *C. mycetoides* to form biofilms on these surfaces highlights a relevant virulence characteristic mainly in the nosocomial environment.

The colonization of mucosal surfaces depends on the ability of bacteria to adhere to epithelial cells. Therefore, the ability to adhere and survive within various cell types can provide advantages to the microorganism in establishing the infectious process. In addition, some pathogens can manipulate the process of internalization by host cells, avoiding their intracellular destruction. Several studies have reported the ability of different *Corynebacterium* species to adhere and survive into epithelial cells (HIRATA, RAPHAEL JR *et al.*, 2004; OTT, 2018). Vero epithelial cells are considered a good model for evaluating the host-bacteria interaction in the urinary tract (ANANIAS; YANO, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2016). There are no data in the literature regarding the ability of *C. mycetoides* to adhere to epithelial cells. Presently, the clinical isolate *C. mycetoides* was able to adhere to Vero cells, moreover, viable intracellular bacteria could be found under the conditions tested, suggesting that *C. mycetoides* presents virulence attributes that makes them able to colonize urinary tract epithelial cells favoring their maintenance and even the development of infection in this

niche. Several factors may contribute to the adhesion to human tissues. For *C. diphtheriae*, several surface proteins were identified, among other factors, involved in this process (OTT, 2018). Factors that contribute to the interaction of *C. mycetoides* with epithelial cells, such as the expression of adhesion-related surface proteins, as well as other interaction mechanisms, still need to be exploited.

In vivo models have been widely used for bacterial virulence studies. The *Caenorhabditis elegans* nematode has been used as a model host to investigate the pathogenic mechanisms of several Gram-positive and Gram-negative human pathogens, including *Corynebacterium* species (ANTUNES *et al.*, 2016; OTT *et al.*, 2012). Antunes and collaborators assessed the influence of harmless and harmful species of *Corynebacterium* (ANTUNES *et al.*, 2016). The nematode was infected with a non-pathogenic *Corynebacterium glutamicum*, the potentially toxigenic *C. diphtheriae*, and *C. ulcerans*. They observed that *C. glutamicum* isolate (20 % mortality rates) had a significant but minor influence on *C. elegans* survival when compared with *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* (70 % and 90 % mortality rates, respectively). Later, similar results were found comparing *Corynebacterium striatum* clinical isolates with different pathogenicity levels (SOUZA *et al.*, 2019). In this study, infection of *C. elegans* with *C. mycetoides* significantly reduced nematode survival, also showing a high mortality rate (about 60 %).

Worm bagging and worm-star are phenomena induced in *C. elegans* by distinct mechanisms that lead to morphological changes in the nematode. Internal egg hatching in *C. elegans* or “worm bagging” is induced as a response to some type of stress, such as exposure to pathogenic bacteria, to protect their eggs from the hostile environment (ANTUNES *et al.*, 2016; MOSSER; MATIC; LEROY, 2011). Worm-star is a morphological alteration induced by the colonization of the worm surface with some pathogenic species, such as *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, and *Leucobacter* sp. (ANTUNES *et al.*, 2015; HODGKIN *et al.*,

2013). It is believed that these aggregates prevent the escape of nematodes, leading them to death. Their carcasses would then serve as a source of nutrients for bacterial growth. Recently, the formation of worm-star, initially included among the morphological changes for pathogenic bacteria, was observed with both pathogenic and nonpathogenic (ANTUNES *et al.*, 2016). Souza and collaborators demonstrated that for *C. striatum*, the induction of worm-star was detected only in the strains that led to 100% mortality in worms (3 days post-infection) (SOUZA *et al.*, 2019). As reported for *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, and *C. striatum*, the clinical isolate *C. mycetoides* 2450 was also able to lead to morphological changes in the worm by inducing worm-bagging and worm-star. These results suggest that *C. mycetoides* is potentially virulent to *C. elegans* nematodes.

## Conclusions

*C. mycetoides* is a rare species of the *Corynebacterium* genus. To the best of our knowledge, this is the first report of *C. mycetoides* isolated from the urinary tract, as well as the first study to address some aspects of the virulence potential of this species. Relevant characteristics for the development of an infectious process were demonstrated as the ability to interact with epithelial cells and to colonize catheters. Furthermore, this species demonstrated to be harmful to *C. elegans*. These results suggest that *C. mycetoides* harbor some virulence attributes that may favor the establishment of disease, especially under certain circumstances as catheter use and immunocompromise. Additional studies addressing more comprehensively the multifactorial virulence mechanisms of this species are needed. Finally, this study highlights the importance of microbiologists and physicians not neglecting pure culture isolation of *Corynebacterium* spp. especially in the nosocomial environment and in the immunocompromised patient.

## 450 **Ethical approval**

451 This study was approved by Research Ethics Committee of Hospital Universitário Pedro  
452 Ernesto (CEP/HUPE– CAAE: 25847614.8.0000.5259).

453

## 454 **Conflict of interest**

455 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or  
456 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

457

## 458 **Authors Contributions**

459 **LOS:** Data curation; Formal analysis; Writing-original draft; Writing-review and editing;  
460 Investigation; Visualization. **EAC:** Data curation; Formal analysis; Writing-original draft;  
461 Writing-review and editing; Investigation; Visualization. **MRBA:** Writing-review;  
462 Investigation; Visualization. **JNR:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and  
463 editing. **LSL:** Data curation; Formal analysis; Writing-review and editing. **AESC:** Data  
464 curation; Formal analysis; Writing-review and editing. **PVPB:** Data curation; Formal  
465 analysis; Writing-review and editing. **VVV:** Conceptualization; Data curation; Formal  
466 analysis; Writing-review and editing; Investigation; Methodology; Resources; Visualization;  
467 Validation. **LSS:** Conceptualization; Data curation; Formal Analysis; Writing-review and  
468 editing; Resources; Visualization; Methodology; Validation. **ALMG:** Conceptualization;  
469 Data curation; Formal Analysis; Writing-review and editing; Resources; Visualization;  
470 Methodology; Validation; Funding acquisition; Project administration; Supervision.

471

## 472 **Funding information**

473 This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior  
474 (CAPES) # 88882.450376/2019-01, and # 88882.315426/2019-01, Fundação Carlos Chagas

Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) # E-26/202.087/2020, # E-26/210.889/2019, and # E-26/211.629/2015, Fundação Oswaldo Cruz (INOVA/FIOCRUZ) # 7481297331 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) # 309948/2018-5.

## **Acknowledgements**

We always offer our deepest thanks to Raphael Hirata Jr. (In Memoriam) for being our eternal supporter and to Rafael Sanches for his availability and dedication in collaborating with us in assessing the image editions of our studies.

## 500    **References**

- 501    ACOSTA, Pamela *et al.* Encefalopatía hiperamoniémica secundaria a infección urinaria por  
502    germen productor de ureasa. Caso clínico pediátrico. *Archivos argentinos de pediatría*, v.  
503    115, n. 6, p. e454–e457, 2017.
- 504    ADDERSON, Elisabeth E. *et al.* Identification of clinical coryneform bacterial isolates:  
505    Comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes.  
506    *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 921–927, 2008.
- 507    ADDERSON, Elisabeth E.; BOUDREAUX, Jan W.; HAYDEN, Randall T. Infections caused  
508    by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Pediatric Infectious Disease Journal*,  
509    v. 27, n. 2, p. 136–141, 2008.
- 510    AHMAD, Nasir M; AHMAD, Khalid M. *Corynebacterium* minutissimum pyelonephritis with  
511    associated bacteraemia: a case report and review of literature. *The Journal of infection*, v. 51,  
512    n. 5, p. e299-303, dez. 2005.
- 513    ALATOOM, Adnan A *et al.* Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of  
514    matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of*  
515    *clinical microbiology*, v. 50, n. 1, p. 160–163, jan. 2012.
- 516    ALIBI, S. *et al.* Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne,  
517    MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathologie Biologie*, v. 63, n. 4–  
518    5, p. 153–157, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2015.07.007>>.
- 519    ALIBI, S *et al.* Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne,  
520    MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathologie-biologie*, v. 63, n. 4–  
521    5, p. 153–157, set. 2015.
- 522    ALIBI, Sana *et al.* Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-  
523    resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8,  
524    2017.

- 525 ALIBI, Sana *et al.* Virulence of clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium*  
 526 *striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces.  
 527 *Microbial pathogenesis*, v. 155, p. 104887, jun. 2021.
- 528 ALTSCHUL, S F *et al.* Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, v.  
 529 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- 530 AMMENTI, Anita *et al.* Updated Italian recommendations for the diagnosis, treatment and  
 531 follow-up of the first febrile urinary tract infection in young children. *Acta paediatrica (Oslo,*  
 532 *Norway : 1992)*, v. 109, n. 2, p. 236–247, fev. 2020.
- 533 ANANIAS, M; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated  
 534 from patients with sepsis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista*  
 535 *brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 41, n. 10, p. 877–883, out. 2008.
- 536 ANTUNES, Camila Azevedo *et al.* *Caenorhabditis elegans* star formation and negative  
 537 chemotaxis induced by infection with corynebacteria. *Microbiology (Reading, England)*, v.  
 538 162, n. 1, p. 84–93, jan. 2016.
- 539 ANTUNES, Camila Azevedo *et al.* Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence  
 540 factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (United Kingdom)*, v. 161, n. 3, p. 639–  
 541 647, 2015.
- 542 ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à  
 543 Saúde. v. 1, p. 44, 2013. Disponível em:  
 544 <[https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca\\_manutencao\\_equipamentos\\_labor](https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca_manutencao_equipamentos_laboratorio_microbiologia.pdf)  
 545 [atorio\\_microbiologia.pdf](https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca_manutencao_equipamentos_laboratorio_microbiologia.pdf)>.
- 546 APARNA, Madhu Sharma; YADAV, Sarita. Biofilms: microbes and disease. *The Brazilian*  
 547 *journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious*  
 548 *Diseases*, v. 12, n. 6, p. 526–530, dez. 2008.
- 549 APERIS, George; MOYSSAKIS, Ioannis. *Corynebacterium minutissimum* endocarditis: a

- case report and review. *The Journal of infection*, v. 54, n. 2, p. e79-81, fev. 2007.
- ARAGÓN, Isabel M *et al.* The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *European urology focus*, v. 4, n. 1, p. 128–138, jan. 2018.
- ASADI KARAM, Mohammad Reza; HABIBI, Mehri; BOUZARI, Saeid. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*, v. 108, n. 69, p. 56–67, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.007>>.
- ATASAYAR, Ewelina *et al.* *Corynebacterium* gottingense sp. nov., isolated from a clinical patient. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 67, n. 11, p. 4494–4499, nov. 2017.
- AYGUN, Gokhan *et al.* A fatal case of urosepsis due to *Corynebacterium riegelii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 475–476, 2013.
- AZIZ, Ramy K *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, v. 9, p. 75, fev. 2008.
- BADELL, Edgar *et al.* *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Research in microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 122–127, 2020.
- BAIO, Paulo Victor Pereira *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013.
- BARBERIS, Claudia *et al.* Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 1–6, 2014.
- BARBERIS, Claudia M. *et al.* *Corynebacterium phoceense* – a rare *Corynebacterium* species isolated from a urine sample. *Access Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2021.
- BARBERIS, Claudia M. *et al.* Total nephrectomy following *Corynebacterium coyleae*

- 575 urinary tract infection. *JMM Case Reports*, v. 5, n. 9, p. 0–3, 2018.
- 576 BARRACLOUGH, Katherine *et al.* *Corynebacterium* peritonitis in Australian peritoneal  
577 dialysis patients: Predictors, treatment and outcomes in 82 cases. *Nephrology Dialysis*  
578 *Transplantation*, v. 24, n. 12, p. 3834–3839, 2009.
- 579 BATEY, R G. Aspects of pathogenesis in a mouse model of infection by *Corynebacterium*  
580 *pseudotuberculosis*. *The Australian journal of experimental biology and medical science*, v.  
581 64 ( Pt 3), p. 237–249, jun. 1986.
- 582 BAYRAK, Omer *et al.* Is single-dose fosfomycin trometamol a good alternative for  
583 asymptomatic bacteriuria in the second trimester of pregnancy? *International urogynecology*  
584 *journal and pelvic floor dysfunction*, v. 18, n. 5, p. 525–529, maio 2007.
- 585 BECHARA, C *et al.* *Corynebacterium jeikeium* pacemaker infection associated with  
586 antineutrophil cytoplasmic antibodies: a single positive blood culture could be sufficient for  
587 diagnosis. *Journal of medical microbiology*, v. 60, n. Pt 2, p. 249–251, fev. 2011.
- 588 BECKFORD-BALL, Jason. Management of suspected bacterial urinary tract infection.  
589 *Nursing times.*, v. 102, n. 36, p. 25–26, 2006.
- 590 BELMARES, Jaime *et al.* *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and  
591 outcomes. *BMC infectious diseases*, v. 7, p. 4, fev. 2007.
- 592 BERGIN, I L *et al.* Isolation and characterization of *Corynebacterium ulcerans* from cephalic  
593 implants in macaques. *Comparative medicine*, v. 50, n. 5, p. 530–535, out. 2000.
- 594 BERNARD, Kathryn. *The genus Corynebacterium and other medically relevant coryneform-*  
595 *like bacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. [S.l: s.n.], 2012
- 596 BERNARD, Kathryn A.; FUNKE, Guido. *Corynebacterium*. [S.l: s.n.], 2015.
- 597 BERNARD, Kathryn A *et al.* *Corynebacterium hindlerae* sp. nov., derived from a human  
598 granuloma, which forms black colonies and black halos on modified Tinsdale medium but is  
599 not closely related to *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa. *International journal of*

- 600 *systematic and evolutionary microbiology*, v. 71, n. 8, ago. 2021.
- 601 BERNIER, Anne Marie; BERNARD, Kathryn. Draft genome sequence for the type strain of  
 602 *Corynebacterium afermentans* LCDC 88-0199T, isolated from a human blood culture.  
 603 *Genome Announcements*, v. 4, n. 4, p. 10–11, 2016.
- 604 BERTUCCINI, Lucia; BALDASSARRI, Lucilla; VON HUNOLSTEIN, Christina.  
 605 Internalization of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory  
 606 epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 37, n. 3, p. 111–118, 2004.
- 607 BILLARD-POMARES, Typhaine *et al.* Diagnosis in France of a Non-Toxigenic tox Gene-  
 608 Bearing Strain of *Corynebacterium diphtheriae* in a Young Male Back From Senegal. *Open*  
 609 *forum infectious diseases*, v. 4, n. 1, p. ofw271, 2017. Disponível em:  
 610 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28480263>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- 611 BININDA-EMONDS, Olaf R.P. The evolution of supertrees. *Trends in Ecology and*  
 612 *Evolution*, v. 19, n. 6, p. 315–322, 2004.
- 613 BIZZINI, A *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry  
 614 as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify  
 615 bacterial strains. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 2, p. 693–696, fev. 2011.
- 616 BLÄCKBERG, Anna *et al.* Infective Endocarditis Due to *Corynebacterium* Species: Clinical  
 617 Features and Antibiotic Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, p. 1–6, 2021.
- 618 BONMARIN, Isabelle *et al.* Diphtheria: A zoonotic disease in France? *Vaccine*, v. 27, n. 31,  
 619 p. 4196–4200, 2009.
- 620 BORDE, Kalyani *et al.* Not always a commensal: A case of mastitis by *Corynebacterium*  
 621 *amycolatum*. *IDCases*. [S.l: s.n.], 2020
- 622 BRCAST. BrCAST - Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos  
 623 Antimicrobianos. *Anvisa*, v. 0, p. 1–29, 2021. Disponível em:  
 624 <<http://brcast.org.br/documentos/>>.

- 625 BROADWAY, Melissa M *et al.* Pilus gene pool variation and the virulence of  
 626 *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *Journal of*  
 627 *bacteriology*, v. 195, n. 16, p. 3774–3783, ago. 2013.
- 628 BURKOVSKI, Andreas. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on  
 629 pathogenicity. *ISRN microbiology*, v. 2013, p. 935736, 2013.
- 630 BURKOVSKI, Andreas. Diphtheria and its Etiological Agents. *Corynebacterium diphtheriae*  
 631 *and Related Toxigenic Species*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 1–14. Disponível  
 632 em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7624-1\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7624-1_1)>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- 633 CAMELLO, T. C.F. *et al.* *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant  
 634 clinical sites of infection: A human pathogen overlooked in emerging countries. *Letters in*  
 635 *Applied Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 458–464, 2009.
- 636 CAMELLO, Thereza Cristina Ferreira *et al.* Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated  
 637 from clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian*  
 638 *Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 39–44, 2003.
- 639 CAMPANILE, Floriana *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains,  
 640 Italy. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p. 75–78, 2009.
- 641 CAPOCACCIA, L; ORTALI, V. [A new species of *Corynebacterium*: the *Corynebacterium*  
 642 *mycetoides* (Castellani) Ortali and Capocaccia 1956]. *Rendiconti - Istituto superiore di sanita*,  
 643 v. 19, n. 6, p. 480–491, 1956.
- 644 CAPOCACCIA, L; ORTALI, V; CAPONEBRAGA, P. [Serological reports and antibiogram  
 645 of *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali and Capocaccia 1956]. *Rendiconti -*  
 646 *Istituto superiore di sanita*, v. 20, n. 9–10, p. 860–864, 1957.
- 647 CARVALHO, Ricardo Vianna De *et al.* Central venous catheter-related infections caused by  
 648 *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in  
 649 paediatric oncology patients. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official*

- 650 publication of the *Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 22, n. 4, p. 347–351, 2018.
- 651 CHAO, C T; HUANG, J W; YEN, C J. *A rare and under-recognized pathogen in peritoneal*
- 652 *dialysis peritonitis: Corynebacterium jeikeium. Peritoneal dialysis international : journal of*
- 653 *the International Society for Peritoneal Dialysis*. [S.l: s.n.]. , 2013
- 654 CHEAN, Roy *et al.* Comparing the identification of *Clostridium* spp. by two Matrix-Assisted
- 655 Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to
- 656 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: a detailed analysis of age of culture and
- 657 sampl. *Anaerobe*, v. 30, p. 85–89, dez. 2014.
- 658 CHRISTENSEN, G D *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue
- 659 culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.
- 660 *Journal of clinical microbiology*, v. 22, n. 6, p. 996–1006, dez. 1985.
- 661 CHU, Christine M; LOWDER, Jerry L. Diagnosis and treatment of urinary tract
- 662 infections across age groups. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 219, n. 1, p.
- 663 40–51, jul. 2018.
- 664 CHUN, Jongsik *et al.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the
- 665 taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
- 666 *Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018.
- 667 CHUN, Jongsik; RAINEY, Fred A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics
- 668 of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
- 669 *Microbiology*, v. 64, n. PART 2, p. 316–324, 2014.
- 670 CLARKE, John-Ross D; ABDUR RAHMAN, Manal; SAUL, Zane. A case of recurrent
- 671 *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: Unanswered questions for the treatment of chronic
- 672 endovascular infections. *IDCases*, v. 18, p. e00610, 2019. Disponível em:
- 673 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214250919301404>>.
- 674 COENYE, Tom *et al.* Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology*

- 675 *Reviews*, v. 29, n. 2, p. 147–167, 2005.
- 676 COLGAN, Richard; WILLIAMS, Mozella. Diagnosis and treatment of acute uncomplicated  
677 cystitis. *American Family Physician*, v. 84, n. 7, p. 771–776, 2011.
- 678 COLLINS, M. D. *Corynebacterium mycetoides* sp. nov., nom. rev. *Zentralblatt fur*  
679 *Bakteriologie. Allgemeine Angewandte und Okologische Microbiologie Abt. I Orig. C Hyg.*, v.  
680 3, n. 3, p. 399–400, 1982. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0721-9571\(82\)80021-](http://dx.doi.org/10.1016/S0721-9571(82)80021-5)  
681 5>.
- 682 COLLINS, M. D.; JONES, D. *Corynebacterium minutissimum* sp. nov., nom. rev.  
683 *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 33, n. 4, p. 870–871, 1 out. 1983.  
684 Disponível em:  
685 <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-33-4-870>>.  
686 Acesso em: 10 jan. 2022.
- 687 COLLINS, Matthew D; BURTON, Ruth A; JONES, Dorothy. *Corynebacterium amycolatum*  
688 sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS*  
689 *Microbiology Letters*, v. 49, n. 3, p. 349–352, 1 mar. 1988. Disponível em:  
690 <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02755.x>>.
- 691 COLOMBO, A V *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human  
692 erythrocytes. *FEMS microbiology letters*, v. 197, n. 2, p. 235–239, abr. 2001.
- 693 CORDEIRO, Melina Aparecida *et al.* Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated  
694 with human cystitis. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society*  
695 *for Microbiology]*, v. 47, n. 2, p. 414–416, 2016.
- 696 CORTES-PENFIELD, Nicolas W; TRAUTNER, Barbara W; JUMP, Robin L P. Urinary  
697 Tract Infection and Asymptomatic Bacteriuria in Older Adults. *Infectious disease clinics of*  
698 *North America*, v. 31, n. 4, p. 673–688, dez. 2017.
- 699 COSTA, Lilia F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite

700 caseosa em caprinos *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the ethiological agent of the  
 701 caseous lymphadenitis in goats Palavras-chave Características do microrganismo e seu  
 702 cultivo. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 1, n. 1, p. 105–115, 2002.  
 703 CRESCI, M *et al.* *Corynebacterium phoceense* sp. nov., strain MC1(T) a new bacterial  
 704 species isolated from human urine. *New microbes and new infections*, v. 14, p. 73–82, nov.  
 705 2016.  
 706 CRUM-CIANFLONE, Nancy F; BALLON-LANDA, Gonzalo; ZORN, George. Photo Quiz.  
 707 Recurrent breast abscess in a 33-year-old woman. *Clinical infectious diseases : an official*  
 708 *publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 59, n. 3, p. 410; 454–5, ago.  
 709 2014.  
 710 CURRY, Chelsea R. *et al.* Encrusted cystitis secondary to *Corynebacterium glucuronolyticum*  
 711 in a 57-year-old man without predisposing factors. *Laboratory Medicine*, v. 46, n. 2, p. 136–  
 712 139, 2015.  
 713 DA ROCHA, Jaqueline Abel *et al.* Early prosthetic valve endocarditis caused by  
 714 *Corynebacterium amycolatum*: the first case reported in Brazil. *Journal of infection in*  
 715 *developing countries*, v. 12, n. 9, p. 806–807, set. 2018.  
 716 DA SILVA TRENTIN, Danielle; BRANDT GIORDANI, Raquel; MACEDO, Alexandre  
 717 José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de  
 718 combate1. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213–236, 2013.  
 719 DALAL, Aman; LIKHI, Rishi. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a  
 720 case report and review of literature. *The Journal of infection*, v. 56, n. 1, p. 77–79, jan. 2008.  
 721 DANESHVAR, Maryam I. *et al.* Identification of some charcoal-black-pigmented CDC  
 722 fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as  
 723 *Corynebacterium anmucosum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p. 4189–4198,  
 724 2004.

- 725 DANGEL, Alexandra *et al.* *Corynebacterium* silvaticum sp. nov., a unique group of NTTB  
 726 corynebacteria in wild boar and roe deer. *International journal of systematic and*  
 727 *evolutionary microbiology*, v. 70, n. 6, p. 3614–3624, jun. 2020.
- 728 DAZAS, Melody *et al.* Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and  
 729 proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *International journal of systematic and*  
 730 *evolutionary microbiology*, v. 68, n. 12, p. 3826–3831, dez. 2018.
- 731 DE MIGUEL, I; RODRÍGUEZ, E; MARTÍN, A M. [*Corynebacterium amycolatum*: sepsis in  
 732 hematologic patients]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, v. 17, n. 7, p. 340–  
 733 341, 1999.
- 734 DE SANTIS, Antonio *et al.* Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infective  
 735 endocarditis with embolic events: a case report. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 1–5,  
 736 2020.
- 737 DE SOUZA, Cassius *et al.* Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum*  
 738 associated with nosocomial outbreak. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 2, p.  
 739 242–248, 2015.
- 740 DE ZOYSA, Aruni *et al.* Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains  
 741 isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *Journal of Clinical*  
 742 *Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4377–4381, 2005.
- 743 DEVRIESE, L. A. *et al.* Identification of *Corynebacterium glucuronolyticum* strains from the  
 744 urogenital tract of humans and pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 12, p. 4657–  
 745 4659, 2000.
- 746 DIAS, Alexandre A.S.O. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* Isolated from an Asymptomatic  
 747 Dog Kept in an Animal Shelter in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil . *Vector-*  
 748 *Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 8, p. 743–748, 2010.
- 749 DIAS, Alexandre Alves de Souza de Oliveira *et al.* *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: An

- 750 emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de Saude Publica*, v. 45, n. 6, p. 1176–  
751 1191, 2011.
- 752 DIOP, Khoudia *et al.* *Corynebacterium* *fournierii* sp. nov., isolated from the female genital  
753 tract of a patient with bacterial vaginosis. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, n. 7, p. 1165–  
754 1174, jul. 2018.
- 755 DONLAN, Rodney M; COSTERTON, J William. Biofilms: survival mechanisms of  
756 clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 2, p. 167–193,  
757 abr. 2002.
- 758 DORELLA, Fernanda Alves *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology,  
759 biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary*  
760 *research*, v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006.
- 761 DOS SANTOS, Cíntia Silva *et al.* Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic  
762 and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages.  
763 *Microbiology and immunology*, v. 54, n. 1, p. 1–10, 2010.
- 764 DOS SANTOS, Louisy Sanches *et al.* Tellurite resistance: a putative pitfall in  
765 *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of*  
766 *General and Molecular Microbiology*, 2015.
- 767 DOWLING, Wentzel Bruce; KOEN, Johan. *Corynebacterium jeikeium* native valve infective  
768 endocarditis case report: a confirmed microbiological and pathological diagnosis from heart  
769 valvular tissue. *European heart journal. Case reports*, v. 4, n. 6, p. 1–4, dez. 2020.
- 770 DYKHUIZEN, Roelf S. *et al.* *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: Multiple  
771 abscess formation in brain and liver. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, n. 6,  
772 p. 637–639, 1995.
- 773 EISENBERG, Tobias *et al.* Nontoxigenic tox-bearing *Corynebacterium ulcerans* infection  
774 among game animals, Germany. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 3, p. 448–452, mar.

- 2014.
- ESKANDAR, Samantha *et al.* Draft Genome Sequence of *Corynebacterium aurimucosum* UMB7769, Isolated from the Female Urinary Tract. *Microbiology resource announcements*, v. 9, n. 22, maio 2020.
- ESTEBAN, J *et al.* Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, v. 18, n. 7, p. 518–521, jul. 1999.
- F., González-Chamorro *et al.* Urinary tract infections and their prevention. *Actas Urológicas Espanolas*, v. 36, n. 1, p. 48–53, 2012. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L51520122%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2011.05.002>>.
- FARRELL, Maureen; DEMPSEY, Jennifer. *Smeltzer & Bare's textbook of medical-surgical nursing*. Third edit ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
- FERNÁNDEZ-NATAL, M. I. *et al.* The isolation of *Corynebacterium coyleae* from clinical samples: Clinical and microbiological data. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, n. 3, p. 177–184, 2008.
- FERNANDEZ-PITTOL, M *et al.* Skin infection by *Corynebacterium diphtheriae* and *Streptococcus pyogenes*: an unusual association. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)*. [S.l: s.n.], dez. 2019
- FERNANDEZ-ROBLAS, R *et al.* In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, n. 5, p. 453–455, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092485790800589X>>.

- 800 FERNÁNDEZ GUERRERO, Manuel L *et al.* Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*  
 801 *endocarditis successfully treated with daptomycin. International journal of antimicrobial*  
 802 *agents*. Netherlands: [s.n.], out. 2012
- 803 FESSLER, Andrea T.; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial Resistance in *Corynebacterium*  
 804 *spp.*, *Arcanobacterium spp.*, and *Trueperella pyogenes*. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 6,  
 805 2017.
- 806 FLORES-MIRELES, Ana; HREHA, Teri N; HUNSTAD, David A. Pathophysiology,  
 807 Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Topics in spinal*  
 808 *cord injury rehabilitation*, v. 25, n. 3, p. 228–240, 2019.
- 809 FUCHS, Frieder *et al.* diphtheriae – Associated Genital Ulceration. v. 26, n. 9, p. 9–10, 2020.
- 810 FUNKE, G *et al.* Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical microbiology*  
 811 *reviews*, v. 10, n. 1, p. 125–159, jan. 1997.
- 812 FUNKE, G; PETERS, K; ARAVENA-ROMAN, M. Evaluation of the RapID CB plus system  
 813 for identification of coryneform bacteria and *Listeria spp.* *Journal of clinical microbiology*, v.  
 814 36, n. 9, p. 2439–2442, set. 1998.
- 815 FUNKE, Guido *et al.* *Clinical microbiology of Coryneform bacteria*. [S.l: s.n.], 1997. v. 10.
- 816 FUNKE, Guido *et al.* Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical  
 817 laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.  
 818 34, n. 5, p. 1124–1128, 1996.
- 819 FUNKE, Guido; LAWSON, Paul A.; COLLINS, Matthew D. *Corynebacterium riegelii* sp.  
 820 nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *Journal of*  
 821 *Clinical Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 624–627, 1998.
- 822 GALAN-SANCHEZ, Fátima *et al.* Urethritis due to *Corynebacterium glucuronolyticum*.  
 823 *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 17, n. 5, p. 720–721, 2011.
- 824 GALAZKA, Artur M; ROBERTSON, Susan E. Immunization against diphtheria with special

- 825 emphasis on immunization of adults. *Vaccine*, v. 14, n. 9, p. 845–857, 1996. Disponível em:  
 826 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0264410X96000217>>.
- 827 GAO, Xin Lei *et al.* Airborne bacterial contaminations in typical Chinese wet market with  
 828 live poultry trade. *Science of the Total Environment*, v. 572, p. 681–687, 2016.
- 829 GASPAR, Andrew H; TON-THAT, Hung. Assembly of distinct pilus structures on the  
 830 surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 4, p. 1526–1533,  
 831 fev. 2006.
- 832 GHERARDI, G *et al.* *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract  
 833 infection: Case report and review of the literature. *IDCases*, v. 2, n. 2, p. 56–58, 2015.
- 834 GOMES, Débora L.R. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in  
 835 nephrostomy catheter-related infection: Evaluation of traits associated with bacterial  
 836 virulence. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 1419–1427, 2009.
- 837 GORIS, Johan *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome  
 838 sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.  
 839 57, n. 1, p. 81–91, 2007.
- 840 GUIMARAES, L. C. *et al.* Complete Genome Sequence of *Corynebacterium urealyticum*  
 841 Strain DSM 7111, Isolated from a 9-Year-Old Patient with Alkaline-Encrusted Cystitis.  
 842 *Genome Announcements*, v. 1, n. 3, p. 2008–2009, 2013.
- 843 GUPTA, Kalpana *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute  
 844 uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious  
 845 Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious  
 846 Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 5, p. 103–120, 2011.
- 847 GUPTA, Kalpana; GRIGORYAN, Larissa; TRAUTNER, Barbara. In the clinic® urinary  
 848 tract infection. *Annals of Internal Medicine*, v. 167, n. 7, p. ITC49–ITC64, 2017a.
- 849 GUPTA, Kalpana; GRIGORYAN, Larissa; TRAUTNER, Barbara. Urinary Tract Infection.

- 850 *Annals of internal medicine*, v. 167, n. 7, p. ITC49–ITC64, out. 2017b.
- 851 HAHN, William O *et al.* Multidrug-Resistant *Corynebacterium striatum* Associated with  
 852 Increased Use of Parenteral Antimicrobial Drugs. *Emerging infectious diseases*, v. 22, n. 11,  
 853 p. 1908–1914, nov. 2016.
- 854 HARD, G C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on  
 855 peritoneal macrophages. *Infection and immunity*, v. 12, n. 6, p. 1439–1449, dez. 1975.
- 856 HAUSER, D. *et al.* Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic  
 857 *Corynebacterium diphtheriae* strains: Correlation with ADP-ribosylation activity assay.  
 858 *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 10, p. 2720–2723, 1993.
- 859 HAYASHI SANT’ANNA, Fernando *et al.* Genomic metrics made easy: what to do and  
 860 where to go in the new era of bacterial taxonomy. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 45, n.  
 861 2, p. 182–200, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1569587>>.
- 862 HENNART, Melanie *et al.* Population genomics and antimicrobial resistance in  
 863 *Corynebacterium diphtheriae*. *bioRxiv*, p. 1–18, 2020.
- 864 HIRATA, Raphael *et al.* Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*  
 865 strains in HEp-2 cells. *FEMS microbiology letters*, v. 215, n. 1, p. 115–119, set. 2002.
- 866 HIRATA, Raphael Jr *et al.* Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by  
 867 toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbial pathogenesis*, v. 36, n. 3, p. 125–  
 868 130, mar. 2004.
- 869 HOCAOĞLU, Meryem *et al.* Maternal ventriculoperitoneal shunt infection due to  
 870 *Corynebacterium xerosis* following caesarean section. *Journal of Obstetrics and*  
 871 *Gynaecology*, v. 39, n. 3, p. 400–402, 2019. Disponível em:  
 872 <<https://doi.org/10.1080/01443615.2018.1457633>>.
- 873 HODGKIN, Jonathan *et al.* Two Leucobacter strains exert complementary virulence on  
 874 Caenorhabditis including death by worm-star formation. *Current biology : CB*, v. 23, n. 21, p.

- 875 2157–2161, nov. 2013.
- 876 HOLMES, R K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene.  
877 *The Journal of infectious diseases*, v. 181 Suppl, p. S156-67, fev. 2000.
- 878 HUGENHOLTZ, Philip *et al.* Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big  
879 sequence data. *ISME Journal*, v. 15, n. 7, p. 1879–1892, 2021. Disponível em:  
880 <<http://dx.doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x>>.
- 881 JACKMAN, Peter J H *et al.* Classification of corynebacteria associated with endocarditis  
882 (group JK) as *Corynebacterium jeikeium* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 9,  
883 n. 1, p. 83–90, 1987. Disponível em:  
884 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202087800607>>.
- 885 JAÉN-LUCHORO, Daniel *et al.* *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and  
886 environmental associated *Corynebacterium*. *Systematic and applied microbiology*, v. 43, n. 1,  
887 p. 126039, jan. 2020.
- 888 JORGENSEN, Ine; SEED, Patrick C. How to Make It in the Urinary Tract: A Tutorial by  
889 *Escherichia coli*. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 10, p. e1002907, 4 out. 2012. Disponível em:  
890 <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002907>>.
- 891 KALT, Fabian *et al.* *Corynebacterium* species rarely cause orthopedic infections. *Journal of*  
892 *Clinical Microbiology*, v. 56, n. 12, p. 1–8, 2018.
- 893 KAMMOUN, M M *et al.* [*Corynebacterium striatum meningitis*]. *Medecine et maladies*  
894 *infectieuses*. France: [s.n.], dez. 2016
- 895 KATES, Olivia; STARR, Kimberly; BOURASSA, Lori. Closing the brief case: nontoxigenic  
896 *Corynebacterium diphtheriae* in a nonhealing wound. *Journal of Clinical Microbiology*, v.  
897 58, n. 12, p. 1–5, 2020.
- 898 KHAMIS, Atieh; RAOULT, Didier; LA SCOLA, Bernard. rpoB gene sequencing for  
899 identification of *Corynebacterium* species. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 9, p.

- 900 3925–3931, set. 2004.
- 901 KHAMIS, Atieh; RAOULT, Didier; SCOLA, Bernard La. Comparison between rpoB and  
 902 16S rRNA Gene Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of  
 903 *Corynebacterium*. v. 43, n. 4, p. 1934–1936, 2005.
- 904 KHARE, Baldeep; V. L. NARAYANA, Sthanam. Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria:  
 905 Roles of sortases and implications for assembly. *Protein Science*, v. 26, n. 8, p. 1458–1473,  
 906 2017.
- 907 KIM, Seonghun *et al.* Identification and functional characterization of the NanH extracellular  
 908 sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of biochemistry*, v. 147, n. 4, p. 523–  
 909 533, abr. 2010.
- 910 KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions  
 911 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, v. 16,  
 912 n. 2, p. 111–120, dez. 1980.
- 913 KIMURA, Shun-Ichi *et al.* Clinical characteristics and predictive factors for mortality in  
 914 coryneform bacteria bloodstream infection in hematological patients. *Journal of infection and*  
 915 *chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 23, n. 3, p. 148–  
 916 153, mar. 2017.
- 917 KISHORE, C K *et al.* Gangrene and bacteremia due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient  
 918 on maintenance hemodialysis. *Indian journal of nephrology*, v. 25, n. 5, p. 317–318, 2015.
- 919 KLEIN, Roger D; HULTGREN, Scott J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis,  
 920 host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature reviews. Microbiology*, v. 18,  
 921 n. 4, p. 211–226, abr. 2020.
- 922 KLINE, Kimberly A; LEWIS, Amanda L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial  
 923 Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiology*  
 924 *spectrum*, v. 4, n. 2, abr. 2016.

- 925 KONINGSTEIN, Maike *et al.* Recommendations for the empirical treatment of complicated  
 926 urinary tract infections using surveillance data on antimicrobial resistance in the Netherlands.  
 927 *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, 2014.
- 928 KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across  
 929 Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, jun. 2018.
- 930 KUMARI, P *et al.* *Corynebacterium afermentans* spp. *afermentans* sepsis in a neurosurgical  
 931 patient. *The Journal of infection*, v. 35, n. 2, p. 201–202, 1997. Disponível em:  
 932 <<http://europepmc.org/abstract/MED/9354364>>.
- 933 KURIA, J K; HOLSTAD, G. Serological investigation of *Corynebacterium*  
 934 *pseudotuberculosis* infection in sheep--correlation between the hemolysis inhibition test and  
 935 the ELISA test. *Acta veterinaria Scandinavica*, v. 30, n. 1, p. 109–110, 1989.
- 936 LALA, Vasimahmed; MINTER, David A. Acute Cystitis. Treasure Island (FL): [s.n.], 2021. .
- 937 LEAL, Sixto M.; JONES, Melissa; GILLIGAN, Peter H. Clinical significance of commensal  
 938 gram-positive rods routinely isolated from patient samples. *Journal of Clinical Microbiology*,  
 939 v. 54, n. 12, p. 2928–2936, 2016.
- 940 LEE, Ja Yeon; LEE, Sun Hwa; KIM, Won Ho. Three-valve endocarditis caused by  
 941 *Corynebacterium striatum*. *Korean Circulation Journal*, v. 48, n. 9, p. 861–862, 2018.
- 942 LEFÈVRE, Charles R. *et al.* Clinical relevance and antimicrobial susceptibility profile of the  
 943 unknown human pathogen *Corynebacterium aurimucosum*. *Journal of Medical Microbiology*,  
 944 v. 70, n. 3, p. 001334, 1 mar. 2021. Disponível em:  
 945 <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.001334>>.
- 946 Acesso em: 5 ago. 2021.
- 947 LENZ, LI. Cateterismo vesical: cuidados, complicações e medidas preventivas. *Arquivos*  
 948 *Catarinenses de Medicina*, v. 35, p. 82–91, 2006. Disponível em:  
 949 <<http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/361.pdf>>.

- 950 LO, Seynabou *et al.* Urinary tract infection with *Corynebacterium aurimucosum* after  
 951 urethroplasty stricture of the urethra: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, v. 9, n.  
 952 1, p. 1–3, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13256-015-0638-0>>.
- 953 LÓPEZ-GONZÁLEZ GILA, J D *et al.* [*Corynebacterium jeikeium* urinary tract infection and  
 954 good clinical response with nitrofurantoin treatment]. *Revista espanola de quimioterapia :*  
 955 *publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*. [S.l: s.n.]. , fev. 2019
- 956 LÓPEZ-MEDRANO, F *et al.* Urinary tract infection due to *Corynebacterium urealyticum* in  
 957 kidney transplant recipients: an underdiagnosed etiology for obstructive uropathy and graft  
 958 dysfunction-results of a prospective cohort study. *Clinical infectious diseases : an official*  
 959 *publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 46, n. 6, p. 825–830, mar. 2008.
- 960 LÓPEZ, Alicia Beteta *et al.* Cistitis y hematuria por *Corynebacterium striatum*. A propósito  
 961 de un caso y revisión de la literatura científica. *Actas Urologicas Espanolas*, v. 33, n. 8, p.  
 962 909–912, 2009.
- 963 MAGIORAKOS, A-P *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-  
 964 resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for  
 965 acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the*  
 966 *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 268–281,  
 967 mar. 2012.
- 968 MAGISTRO, Giuseppe; STIEF, Christian G. The Urinary Tract Microbiome: The Answer to  
 969 All Our Open Questions? *European urology focus*, v. 5, n. 1, p. 36–38, jan. 2019.
- 970 MAHATO, Nitish Kumar *et al.* Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of  
 971 DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek*,  
 972 *International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 110, n. 10, p. 1357–1371,  
 973 2017.
- 974 MAHESWARI, Uma B *et al.* Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers

- 975 of uropathogenic *Escherichia coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Indian*  
 976 *journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India*, v. 29, n. 4, p. 277–281,  
 977 out. 2013.
- 978 MAKI, D G; WEISE, C E; SARAFIN, H W. A semiquantitative culture method for  
 979 identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England journal of medicine*, v.  
 980 296, n. 23, p. 1305–1309, jun. 1977.
- 981 MANCINI, Fabiola *et al.* Identification and molecular discrimination of toxigenic and  
 982 nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain  
 983 reaction assays. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 73, n. 2, p. 111–120, jun.  
 984 2012.
- 985 MANDLIK, Anjali *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target  
 986 human pharyngeal epithelial cells. *Molecular microbiology*, v. 64, n. 1, p. 111–124, abr.  
 987 2007.
- 988 MARRIE, T J; COSTERTON, J W. Scanning and transmission electron microscopy of in situ  
 989 bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *Journal of clinical*  
 990 *microbiology*, v. 19, n. 5, p. 687–693, maio 1984.
- 991 MARTINS, C. A.S. *et al.* Microbiological and host features associated with corynebacteriosis  
 992 in cancer patients: A five-year study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 6, p.  
 993 905–913, 2009.
- 994 MATSUNAMI, Masatoshi *et al.* Urosepsis caused by *Globicatella sanguinis* and  
 995 *Corynebacterium riegelii* in an adult: case report and literature review. *Journal of infection*  
 996 *and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 18, n. 4, p.  
 997 552–554, ago. 2012.
- 998 MATTOS-GUARALDI, A L; DUARTE FORMIGA, L C; PEREIRA, G A. Cell surface  
 999 components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes and infection*, v. 2, n.

- 1000 12, p. 1507–1512, out. 2000.
- 1001 MATTOS-GUARALDI, A L; FORMIGA, L C. Relationship of biotype and source to the  
 1002 hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*. *Brazilian journal of medical and*  
 1003 *biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 24, n. 4, p.  
 1004 399–406, 1991.
- 1005 MATTOS-GUARALDI, A L; FORMIGA, L C; ANDRADE, A F. Cell surface  
 1006 hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae*  
 1007 strains evaluated by different methods. *Current microbiology*, v. 38, n. 1, p. 37–42, jan. 1999.
- 1008 MAUREY, C. *et al.* Clinical description of *Corynebacterium urealyticum* urinary tract  
 1009 infections in 11 dogs and 10 cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 60, n. 4, p. 239–246,  
 1010 2019.
- 1011 MCCONNELL, Scott A *et al.* Protein Labeling via a Specific Lysine-Isopeptide Bond Using  
 1012 the Pilin Polymerizing Sortase from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of the American*  
 1013 *Chemical Society*, v. 140, n. 27, p. 8420–8423, jul. 2018.
- 1014 MCLELLAN, Lisa K.; HUNSTAD, David A. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and  
 1015 Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, v. 22, n. 11, p. 946–957, 2016.
- 1016 MCMULLEN, Allison R *et al.* When Good Bugs Go Bad : Epidemiology and Antimicrobial  
 1017 Resistance Profiles of Pathogen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 11, p. 1–  
 1018 10, 2017a.
- 1019 MCMULLEN, Allison R *et al.* When Good Bugs Go Bad: Epidemiology and Antimicrobial  
 1020 Resistance Profiles of *Corynebacterium striatum*, an Emerging Multidrug-Resistant,  
 1021 Opportunistic Pathogen. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 11, nov. 2017b.
- 1022 MEIER-KOLTHOFF, Jan P *et al.* Genome sequence-based species delimitation with  
 1023 confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, v. 14, p. 60, fev.  
 1024 2013.

- 1025 MEIER-KOLTHOFF, Jan P; GÖKER, Markus. TYGS is an automated high-throughput  
 1026 platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p.  
 1027 2182, maio 2019.
- 1028 MEINEL, Dominik M. *et al.* Next generation sequencing analysis of nine *Corynebacterium*  
 1029 *ulcerans* isolates reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria toxin-encoding  
 1030 pathogenicity island. *Genome Medicine*, v. 6, n. 11, p. 1–13, 2014.
- 1031 MELTON-CELSA, Angela R. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function.  
 1032 *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 4, p. 1–21, 2014.
- 1033 MEŠTROVIĆ, Tomislav *et al.* A ‘pathogenic needle’ in a ‘commensal haystack’: Genetic  
 1034 virulence signatures of *Corynebacterium glucuronolyticum* that may drive its infectious  
 1035 propensity for the male urogenital system. *Medical Hypotheses*, v. 126, n. March, p. 38–41,  
 1036 2019.
- 1037 MINKIN, Ruth; SHAPIRO, Janet M. *Corynebacterium afermentans* Lung Abscess and  
 1038 Empyema in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Southern Medical*  
 1039 *Journal*, v. 97, n. 4, p. 395–397, 2004.
- 1040 MOORE PARDO, Shylah M *et al.* Disseminated *Corynebacterium jeikeium* Infection in  
 1041 Cancer Patients. *Cureus*, v. 12, n. 6, p. 6–13, 2020.
- 1042 MORAES, Gleiciane *et al.* Homology modeling, molecular dynamics and QM/MM study of  
 1043 the regulatory protein PhoP from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of molecular*  
 1044 *modeling*, v. 18, n. 3, p. 1219–1227, mar. 2012.
- 1045 MOSSER, Thomas; MATIC, Ivan; LEROY, Magali. Bacterium-induced internal egg  
 1046 hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Applied*  
 1047 *and environmental microbiology*, v. 77, n. 22, p. 8189–8192, nov. 2011.
- 1048 MOTHERSHED, Elizabeth A *et al.* Development of a real-time fluorescence PCR assay for  
 1049 rapid detection of the diphtheria toxin gene. *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 12, p.

- 1050 4713–4719, dez. 2002.
- 1051 MUNGELLUZZI, C; CAPRILLI, F. [*Corynebacterium mycetoides*, (Castellani) Ortali and  
 1052 Capocaccia, 1956. Etiologic agent of tropical ulcer]. *Archivio italiano di scienze mediche  
 1053 tropicali e di parassitologia*, v. 46, n. 7, p. 301–304, 1965.
- 1054 NICOLLE, L E. Complicated urinary tract infection in adults. *The Canadian journal of  
 1055 infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et  
 1056 de la microbiologie medicale*, v. 16, n. 6, p. 349–360, nov. 2005.
- 1057 NOVO-VELEIRO, I. *et al.* Paucisymptomatic infectious prostatitis as a cause of fever  
 1058 without an apparent origin. A series of 19 patients. *European Journal of Clinical  
 1059 Microbiology and Infectious Diseases*, v. 32, n. 2, p. 263–268, 2013.
- 1060 NUDEL, K *et al.* Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant  
 1061 pathogen of immunocompromised patients. *Clinical microbiology and infection : the official  
 1062 publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 24,  
 1063 n. 9, p. 1016.e7-1016.e13, set. 2018.
- 1064 ODABASI, Zekaver; MERT, Ali. Candida urinary tract infections in adults. *World Journal of  
 1065 Urology*, v. 38, n. 11, p. 2699–2707, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00345-019-02991-5>>.
- 1067 OLENDER, Alina; ŁETOWSKA, Iwona. [Wound infections due to opportunistic  
 1068 *Corynebacterium* species]. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, v. 62, n. 2, p. 135–140,  
 1069 2010.
- 1070 OLIVEIRA, Alberto *et al.* *Insight of Genus Corynebacterium: Ascertaining the Role of  
 1071 Pathogenic and Non-pathogenic Species* . *Frontiers in Microbiology* . [S.l: s.n.]. Disponível  
 1072 em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01937>>. , 2017
- 1073 ÖLMEZ, Serpil *et al.* Comparison of Conventional Methods, Automated Systems, and DNA  
 1074 Sequence Analysis Methods in the Identification of *Corynebacterium afermentans* and

- 1075 *Corynebacterium mucifaciens* Bacteria Isolated from Blood and Catheter Culture Samples.  
 1076 *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, v. 27, n. 7, p. 919–923, jul. 2021.
- 1077 OTEO, J *et al.* [Significant bacteremias by *Corynebacterium amycolatum*: an emergent  
 1078 pathogen]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, v. 19, n. 3, p. 103–106, mar.  
 1079 2001.
- 1080 OTSUKA, Yoshihito *et al.* *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant  
 1081 coryneform bacterium isolated from human infections. *Journal of Clinical Microbiology*,  
 1082 2005.
- 1083 OTT, Lisa. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS microbiology*, v. 4, n. 1, p.  
 1084 85–103, 2018.
- 1085 OTT, Lisa *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is  
 1086 involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC*  
 1087 *Microbiology*, v. 10, 2010.
- 1088 OTT, Lisa *et al.* Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria.  
 1089 *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 413–421, 2012.
- 1090 OUMER, Yisiak *et al.* Catheter-Associated Urinary Tract Infection: Incidence, Associated  
 1091 Factors and Drug Resistance Patterns of Bacterial Isolates in Southern Ethiopia. *Infection and*  
 1092 *drug resistance*, v. 14, p. 2883–2894, 2021.
- 1093 PACHECO, Luis G. C. *et al.* Draft Genome Sequences of Two Species of “Difficult-to-  
 1094 Identify” Human-Pathogenic Corynebacteria: Implications for Better Identification Tests.  
 1095 *Journal of Genomics*, v. 3, p. 82–84, 2015.
- 1096 PACHECO, Luis G C *et al.* A Role for Sigma Factor  $\sigma(E)$  in *Corynebacterium*  
 1097 *pseudotuberculosis* Resistance to Nitric Oxide/Peroxide Stress. *Frontiers in microbiology*, v.  
 1098 3, p. 126, 2012.
- 1099 PADMANABHAN, Roshan *et al.* Genome sequence and description of *Corynebacterium*

- 1100 ihmii sp. nov. *Standards in genomic sciences*, v. 9, n. 3, p. 1128–1143, jun. 2014.
- 1101 PALLEN, M J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the  
1102 polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology*, v. 44, n. 12, p. 1025–1026, dez.  
1103 1991.
- 1104 PALLETT, Ann; HAND, Kieran. Complicated urinary tract infections: practical solutions for  
1105 the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *The Journal of antimicrobial*  
1106 *chemotherapy*, v. 65 Suppl 3, p. iii25-33, nov. 2010.
- 1107 PALMER, Marike *et al.* All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species  
1108 boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy. *International Journal of*  
1109 *Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2937–2948, 1 abr. 2020. Disponível  
1110 em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004124>>.  
1111 Acesso em: 12 ago. 2021.
- 1112 PARTE, Aidan C *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)  
1113 moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v.  
1114 70, n. 11, p. 5607–5612, nov. 2020.
- 1115 PAZ-ZARZA, Victor Manuel *et al.* [Pseudomonas aeruginosa: Pathogenicity and  
1116 antimicrobial resistance in urinary tract infection]. *Revista chilena de infectologia : organo*  
1117 *oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, v. 36, n. 2, p. 180–189, abr. 2019.
- 1118 PEIXOTO, Renata Stavracakis *et al.* Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae*  
1119 strain isolated from a case of osteomyelitis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 11, p.  
1120 1311–1321, nov. 2016.
- 1121 PICHON, M. *et al.* A rare case of *Corynebacterium riegelii* urosepsis: Role of the MALDI-  
1122 TOF mass spectrometry in the identification of emerging pathogens. *Medecine et Maladies*  
1123 *Infectieuses*, v. 49, n. 6, p. 474–477, 2019. Disponível em:  
1124 <<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.06.005>>.

- 1125 PITCHER, D *et al.* Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract  
 1126 infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *International journal of*  
 1127 *systematic bacteriology*, v. 42, n. 1, p. 178–181, jan. 1992.
- 1128 PORTEVIN, Damien *et al.* A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of  
 1129 mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the*  
 1130 *National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 1, p. 314–319, jan.  
 1131 2004.
- 1132 PROCOP, Gary W. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* . Seventh  
 1133 ed ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.
- 1134 RAMASAMY, Dhamodharan *et al.* A polyphasic strategy incorporating genomic data for the  
 1135 taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and*  
 1136 *Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. PART 2, p. 384–391, 2014.
- 1137 RAMOS, Juliana Nunes *et al.* Bloodstream and catheter-related infections due to different  
 1138 clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC*  
 1139 *infectious diseases*, v. 19, n. 1, p. 672, jul. 2019.
- 1140 RAMOS, Juliana Nunes *et al.* Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium*  
 1141 *striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro,  
 1142 Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 9, p. e180051, 2018.
- 1143 RIEGEL, P. *et al.* Taxonomic study of *Corynebacterium* group ANF-1 strains: Proposal of  
 1144 *Corynebacterium afermentans* sp. nov. containing the subspecies *C. afermentans* subsp.  
 1145 *afermentans* subsp. nov. and *C. afermentans* subsp. *lipophilum* subsp. nov. *International*  
 1146 *Journal of Systematic Bacteriology*, v. 43, n. 2, p. 287–292, 1993.
- 1147 RIZVI, Meher *et al.* Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical  
 1148 site infections in a tertiary care hospital of North India. *Journal of infection and public*  
 1149 *health*, v. 6, n. 4, p. 283–288, ago. 2013.

- 1150 ROACH, David J. *et al.* A Year of Infection in the Intensive Care Unit: Prospective Whole  
 1151 Genome Sequencing of Bacterial Clinical Isolates Reveals Cryptic Transmissions and Novel  
 1152 Microbiota. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 7, p. 1–21, 2015.
- 1153 ROBERT, Kuthan; ANNA, Sawicka-Grzelak; GRAŻYNA, Mlynarczyk. *Corynebacterium*  
 1154 Species Causing Urinary Tract Infections. *Microbiology Research Journal International*, v.  
 1155 24, n. 5, p. 1–9, 2018.
- 1156 ROCHA, Danilo J.P. *et al.* Whole-genome sequencing reveals misidentification of a  
 1157 multidrug-resistant urine clinical isolate as *Corynebacterium urealyticum*. *Journal of Global*  
 1158 *Antimicrobial Resistance*, v. 23, p. 16–19, 2020.
- 1159 RODRIGUEZ-R, Luis M.; KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. Bypassing Cultivation To  
 1160 Identify Bacterial Species Identify Bacterial Species. *Microbe*, v. 9, n. 3, p. 111–118, 2014.
- 1161 ROTH, Sophie *et al.* Late-onset native valve endocarditis caused by *Corynebacterium*  
 1162 *kroppenstedtii*. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the*  
 1163 *International Society for Infectious Diseases*. Canada: [s.n.], dez. 2020
- 1164 ROY, Moni; AHMAD, Sharjeel. Rare case of *Corynebacterium striatum* septic arthritis. *BMJ*  
 1165 *case reports*, v. 2016, 23 set. 2016. Disponível em:  
 1166 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664229>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- 1167 RUIZ-PINO, M *et al.* Male genitourinary infections by *Corynebacterium glucuronolyticum*. A  
 1168 review and clinical experience. *Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la*  
 1169 *Sociedad Espanola de Quimioterapia*. [S.l: s.n.], out. 2019
- 1170 RYCHERT, Jenna. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the  
 1171 Identification of Microorganisms. *Journal of Infectiology*, v. 2, n. 4, p. 1–5, 2019.
- 1172 SABBADINI, Priscila Soares *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin,  
 1173 characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in  
 1174 HEp-2 cells. *Microbial pathogenesis*, v. 52, n. 3, p. 165–176, mar. 2012.

- 1175 SABBADINI, Priscila Soares *et al.* Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic  
 1176 *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 5, p.  
 1177 706–711, ago. 2010.
- 1178 SABINO, Yasmin Neves Vieira *et al.* Characterization of antibiotic resistance genes in the  
 1179 species of the rumen microbiota. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em:  
 1180 <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13118-0>>.
- 1181 SAKHI, Hamza *et al.* Encrusted Urinary Tract Infections Due to *Corynebacteria* Species.  
 1182 *Kidney International Reports*, v. 6, n. 1, p. 179–186, 2021. Disponível em:  
 1183 <<https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.10.034>>.
- 1184 SALEM, Nagla *et al.* *Corynebacterium urealyticum*: A comprehensive review of an  
 1185 understated organism. *Infection and Drug Resistance*, v. 8, p. 129–145, 2015.
- 1186 SANCHEZ ELUCHANS, Nahuel *et al.* *Corynebacterium kroppenstedtii* breast infections:  
 1187 Report of four cases. *Revista Argentina de Microbiologia*, n. xxxx, 2021. Disponível em:  
 1188 <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.002>>.
- 1189 SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, J. *et al.* In vitro activity of newer antibiotics against  
 1190 *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium urealyticum*.  
 1191 *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 22, n. 5, p. 492–496, 2003.
- 1192 SANTOS, Carolina S. *et al.* Efficient differentiation of *Corynebacterium striatum*,  
 1193 *Corynebacterium amycolatum* and *Corynebacterium xerosis* clinical isolates by multiplex  
 1194 PCR using novel species-specific primers. *Journal of Microbiological Methods*, v. 142, n.  
 1195 September, p. 33–35, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.09.002>>.
- 1196 SATO, Kota; UCHIYAMA, Michihiro. <em>*Corynebacterium jeikeium*
 1197 bacteraemia and pulmonary infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. *BMJ*  
 1198 *Case Reports*, v. 2012, p. bcr1120115097, 20 mar. 2012. Disponível em:  
 1199 <<http://casereports.bmj.com/content/2012/bcr.11.2011.5097.abstract>>.

- 1200 SCHEUTZ, Flemming *et al.* Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for  
 1201 subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical*  
 1202 *Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 2951–2963, 2012.
- 1203 SCHLEIFER, Karl Heinz. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future.  
 1204 *Systematic and Applied Microbiology*, v. 32, n. 8, p. 533–542, 2009. Disponível em:  
 1205 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.002>>.
- 1206 SCHOEN, Christoph *et al.* Life-threatening infection caused by daptomycin-resistant  
 1207 *Corynebacterium jeikeium* in a neutropenic patient. *Journal of clinical microbiology*, v. 47,  
 1208 n. 7, p. 2328–2331, jul. 2009.
- 1209 SENGUPTA, Mallika *et al.* *Corynebacterium amycolatum*: An unexpected pathogen in the  
 1210 ear. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 12, p. 10–12, 2015.
- 1211 SENTAUSA, E.; FOURNIER, P. E. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic  
 1212 taxonomy. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, n. 9, p. 790–795, 2013. Disponível em:  
 1213 <<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12181>>.
- 1214 SHANMUGAM, Lakshmi *et al.* A Rare Case Report of Non-toxigenic *Corynebacterium*  
 1215 *diphtheriae* Bloodstream Infection in an Uncontrolled Diabetic With Peripheral Vascular  
 1216 Disease. *Cureus*, v. 13, n. 5, 2021.
- 1217 SHARIFF, Malini; ADITI; BERI, Kiran. *Corynebacterium striatum*: An emerging respiratory  
 1218 pathogen. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 12, n. 7, p. 581–586, 2018.
- 1219 SHARMA, Naresh Chand *et al.* Diphtheria. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 5, n. 1, 2019.
- 1220 SHIN, Ji Young *et al.* Postoperative Abdominal Infection Caused by *Corynebacterium*  
 1221 *minutissimum*. *Infection & chemotherapy*, v. 46, n. 4, p. 261–263, dez. 2014.
- 1222 SHU, Si Yun *et al.* A New Neural Pathway from the Ventral *Striatum* to the Nucleus Basalis  
 1223 of Meynert with Functional Implication to Learning and Memory. *Molecular neurobiology*,  
 1224 v. 56, n. 10, p. 7222–7233, out. 2019.

- 1225 SIMÕES E SILVA, Ana Cristina; OLIVEIRA, Eduardo A; MAK, Robert H. Urinary tract  
1226 infection in pediatrics: an overview. *Jornal de pediatria*, v. 96 Suppl 1, p. 65–79, 2020.
- 1227 SIMPSON-LOUREDO, Liliane *et al.* *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and  
1228 dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. *Antonie*  
1229 *van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 2, p. 343–352, fev. 2014.
- 1230 SOKOL-LESZCZYNSKA, Beata *et al.* *Corynebacterium coyleae* as potential urinary tract  
1231 pathogen. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 38, n. 7, p.  
1232 1339–1342, 2019.
- 1233 SORIANO, F.; TAUCH, A. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium*  
1234 *urealyticum*: Urinary tract stones and genomics as the Rosetta Stone. *Clinical Microbiology*  
1235 *and Infection*, v. 14, n. 7, p. 632–643, 2008.
- 1236 SORIANO, Francisco *et al.* In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and  
1237 erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *Journal*  
1238 *of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, n. 2, p. 353–356, 2009.
- 1239 SOUZA, Cassius De *et al.* Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards  
1240 *Caenorhabditis elegans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 112, n. 9, p. 1331–1340, set. 2019.
- 1241 STACKEBRANDT, E; GOEBEL, B M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA  
1242 Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in  
1243 Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 44, n. 4,  
1244 p. 846–849, 1994. Disponível em:  
1245 <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-44-4-846>>.
- 1246 STACKEBRANDT, Erko; JONAS, Ebers. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold  
1247 standards. *Microbiology Today*, v. 33, p. 152–155, 2006. Disponível em:  
1248 <[https://www.semanticscholar.org/paper/Taxonomic-parameters-revisited-%3A-tarnished-](https://www.semanticscholar.org/paper/Taxonomic-parameters-revisited-%3A-tarnished-gold-)  
1249 [gold-](https://www.semanticscholar.org/paper/Taxonomic-parameters-revisited-%3A-tarnished-gold-)

- Stackebrandt/50b6c2ffe163a091511d9e857a1ce334184c7655%0Ahttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Taxonomic+parameters+revisited:+tarnished+gold+st>.
- STAPLETON, Ann E. The Vaginal Microbiota and Urinary Tract Infection. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 6, dez. 2016.
- STEFANÍSKA, I *et al.* Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish journal of veterinary sciences*, v. 13, n. 1, p. 143–149, 2010.
- SUPERTI, Silvana Vargas *et al.* *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: The emergence of an opportunistic pathogen. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 51, n. 2, p. 115–116, 2009.
- SZEMRAJ, Magdalena; KWASZEWSKA, Anna; SZEWCZYK, Eligia M. New Gene Responsible for Resistance of Clinical *Corynebacteria* to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B. *Polish journal of microbiology*, v. 67, n. 2, p. 237–240, jun. 2018.
- TAGUCHI, Masashi *et al.* Pancreatic abscess caused by *Corynebacterium coyleae* mimicking malignant neoplasm. *Pancreas*, v. 33, n. 4, p. 425–429, nov. 2006.
- TANG, Lin. Taxonomy of Bacteria and Archaea. *Nature methods*, v. 17, n. 6, p. 562, jun. 2020.
- TEJEDOR-JUNCO, M T *et al.* Isolation of nitrate-reductase positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* from dromedary camels. *Tropical animal health and production*, v. 40, n. 3, p. 165–167, abr. 2008.
- THEEL, Elitza S. *et al.* Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 3093–3095, 2012.

- 1275 THOMPSON, Cristiane C *et al.* *Microbial genomic taxonomy. BMC genomics*. [S.l: s.n.], ,  
1276 dez. 2013
- 1277 THOMPSON, J D *et al.* The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple  
1278 sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 24, p.  
1279 4876–4882, dez. 1997.
- 1280 TINDALL, B J *et al.* Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic  
1281 purposes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. Pt 1, p.  
1282 249–266, jan. 2010.
- 1283 TIWARI, Tejpratap S.P. *et al.* Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to  
1284 toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 3, p. 395–401,  
1285 2008.
- 1286 TON-THAT, Hung; SCHNEEWIND, Olaf. Assembly of pili on the surface of  
1287 *Corynebacterium diphtheriae*. *Molecular microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1429–1438, nov. 2003.
- 1288 TORIBIO, J. Alvaro; MARRODÁN, Teresa; FERNÁNDEZ-NATAL, Isabel. Orbital implant  
1289 infection by *Corynebacterium amycolatum*. *Orbit (London)*, v. 36, n. 5, p. 344–346, 2017.  
1290 Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01676830.2017.1337172>>.
- 1291 TORRES, Luciene de Fátima Costa *et al.* Multiplex polymerase chain reaction to identify and  
1292 determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview  
1293 of human and animal infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 272–  
1294 279, 2013.
- 1295 TROST, Eva *et al.* Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans*  
1296 genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC genomics*, v. 12, p. 383, jul.  
1297 2011.
- 1298 TROST, Eva; GÖTKER, Susanne; *et al.* Complete genome sequence and lifestyle of black-  
1299 pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1)

- 1300 isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics*, v. 11,  
1301 n. 1, p. 1–16, 2010.
- 1302 TROST, Eva *et al.* Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights  
1303 into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria,  
1304 endocarditis, and pneumonia. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 12, p. 3199–3215, 2012.
- 1305 TROST, Eva; OTT, Lisa; *et al.* The complete genome sequence of *Corynebacterium*  
1306 *pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis  
1307 reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, v.  
1308 11, n. 1, 2010.
- 1309 VAN DAM, A P *et al.* [A case of diphtheria in the Netherlands due to an infection with  
1310 *Corynebacterium ulcerans*]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, v. 147, n. 9, p. 403–  
1311 406, mar. 2003.
- 1312 VARGHESE, Neha J. *et al.* Microbial species delineation using whole genome sequences.  
1313 *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 14, p. 6761–6771, 2015.
- 1314 WAGNER, K. S. *et al.* Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of  
1315 *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiology and Infection*, v. 138, n. 11, p. 1519–1530, 2010.
- 1316 WAGNER, Karen S. *et al.* Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000–2009.  
1317 *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 2, p. 217–225, fev. 2012.
- 1318 WANG, Junrui *et al.* Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*  
1319 among susceptible patients in a tertiary hospital in China. *Journal of infection in developing*  
1320 *countries*, v. 10, n. 12, p. 1299–1305, dez. 2016.
- 1321 WANG, X *et al.* Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of  
1322 China: an emerging national nosocomial epidemic. *The Journal of hospital infection*, v. 110,  
1323 p. 67–75, abr. 2021.
- 1324 WAUTERS, G. *et al.* Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic

- 1325 fermentative corynebacteria of human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 5, p.  
1326 1430–1432, 1998.
- 1327 WAYNE, L G. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the  
1328 report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics.  
1329 *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology,*  
1330 *infectious diseases, virology, parasitology*, v. 268, n. 4, p. 433–434, jun. 1988.
- 1331 WEERASEKERA, Dulanthi *et al.* Beyond diphtheria toxin: Cytotoxic proteins of  
1332 *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (United*  
1333 *Kingdom)*, v. 165, n. 8, p. 876–890, 2019.
- 1334 WOESE, Carl R; FOX, George E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The  
1335 primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 11, p. 5088 LP  
1336 – 5090, 1 nov. 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/74/11/5088.abstract>>.
- 1337 YANAGAWA, R; HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites and  
1338 pathogens of the genus *Corynebacterium*. *Infection and immunity*, v. 13, n. 4, p. 1293–1295,  
1339 abr. 1976.
- 1340 YASSIN, A. F.; STEINER, U.; LUDWIG, W. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and  
1341 emended description of *Corynebacterium minutissimum* collins and Jones (1983).  
1342 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 1001–  
1343 1005, 2002.
- 1344 YOON, Seok-Hwan *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S  
1345 rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and*  
1346 *evolutionary microbiology*, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, maio 2017.
- 1347 YOON, Seoyoung *et al.* Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel  
1348 mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean Journal of*  
1349 *Laboratory Medicine*, v. 31, n. 1, p. 47–48, 2011.

- 1350 ZAKIKHANY, K; NEAL, S; EFSTRATIOU, A. Emergence and molecular characterisation  
 1351 of non-toxicogenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United  
 1352 Kingdom, 2003-2012. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles*  
 1353 = *European communicable disease bulletin*, v. 19, n. 22, jun. 2014.
- 1354 ZAKIKHANY, Katherina; EFSTRATIOU, Androulla. *Diphtheria in Europe: Current*  
 1355 *problems and new challenges. Future Microbiology*. [S.l.]: Future Microbiol. , maio 2012
- 1356 ZASADA, A A; MOSIEJ, E. Contemporary microbiology and identification of  
 1357 *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Letters in applied microbiology*, v. 66, n. 6,  
 1358 p. 472–483, jun. 2018.
- 1359 ZASADA, Aleksandra Anna; FORMIŃSKA, Kamila; RZECZKOWSKA, Magdalena.  
 1360 [Occurrence of pili genes in *Corynebacterium diphtheriae* strains]. *Medycyna doświadczalna i*  
 1361 *mikrobiologia*, v. 64, n. 1, p. 19–27, 2012.

1362

1363 **Legends of figures**

1364

1365 **Figure 1.** Microbiological features of *Corynebacterium mycetoides* clinical isolated recovered  
 1366 from urine culture of an elderly female patient. (A) Colonial characteristics on 5% sheep  
 1367 blood agar after incubation for 48 hours at 37°C and (B) Gram staining (original  
 1368 magnification, ×1000) showing pleomorphic Gram-positive bacillary forms.

1369

1370 **Figure 2.** Phylogenetic tree of 16S rRNA gene showing position of the *Corynebacterium*  
 1371 *mycetoides* 2450 against the most closely related type strains of *Corynebacterium* genus.  
 1372 GenBank accession numbers of 16S rRNA are indicated in parentheses. Alignment was  
 1373 performed with partial sequence (1465-1525 bp) of the 16S rRNA gene. The sequences were  
 1374 aligned using CLUSTALX2 with standard parameters, the phylogenetic inference was

obtained using the maximum likelihood method and the MEGAX software. The inferred distance was calculated using the Kimura-2 parameters model. Bootstrap values (>60%) based on 1.000 repetitions are shown. The sequence of *Acidimicrobium ferrooxidans* DSM 10331<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bar 0,020% estimated sequence divergence.

**Figure 3.** Phylogenetic tree of *rpoB* gene showing the position of the *Corynebacterium mycetoides* 2450 against to the most closely related type strains within the *Corynebacterium* genus. GenBank accession numbers of *rpoB* are indicated in parentheses. Alignment was performed with partial sequence (432 bp) of the *rpoB* gene. The sequences were aligned using CLUSTALX2 with standard parameters, the phylogenetic inference was obtained using the maximum likelihood method and the MEGAX software. The inferred distance was calculated using the Kimura-2 parameters model. Bootstrap values (>60%) based on 1.000 repetitions are shown. The sequence of *Actinopolyspora halophila* DSM 43834<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bar 0,10% estimated sequence divergence.

**Figure 4.** *Corynebacterium mycetoides* adherence to abiotic surfaces evaluated by qualitative and semiquantitative tests. (A) Adherence to glass surface: I, non-adherent *C. mycetoides* 2450 clinical isolate; II, adherent *Corynebacterium diphtheriae* TR241 strain (positive control). (B) Absorbance values obtained by spectrophotometry at 570 nm of sessile forms of *C. mycetoides* 2450 clinical isolate and *Corynebacterium diphtheriae* CDC-E8392 strain (positive control) on polystyrene surface. Culture medium (TSB) was used as negative control.  $p < 0.05$ . (C) *C. mycetoides* 2450 biofilm production on surfaces of catheter segments evaluated by qualitative assays: I, polyurethane catheter; II, silicone catheter; III, latex catheter.

**Figure 5.** *Corynebacterium mycetoides* 2450 interaction with Vero epithelial cells analyzed at different periods of incubation (1-6 hours). Number of viable bacteria (A) associated with and (B) internalized by Vero cells. Data presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments carried out in triplicate.

**Figure 6.** Survival and morphological alterations of *Caenorhabditis elegans* nematodes infected with *Corynebacterium mycetoides* 2450. (A) Survival of nematodes infected with *C. mycetoides* 2450 or fed with *Escherichia coli* OP50 (negative control). Curves were compared using the log rank test and considered statistically different ( $p < 0.05$ ). (B) Photomicrography (x40) of *C. elegans* internal egg hatching (worm bagging) induced by the clinical isolate.

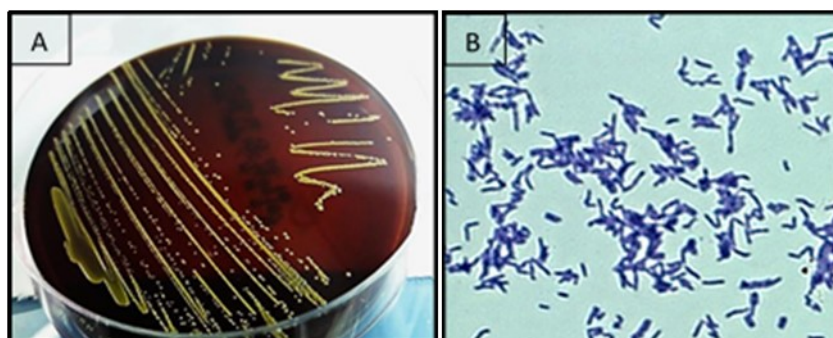
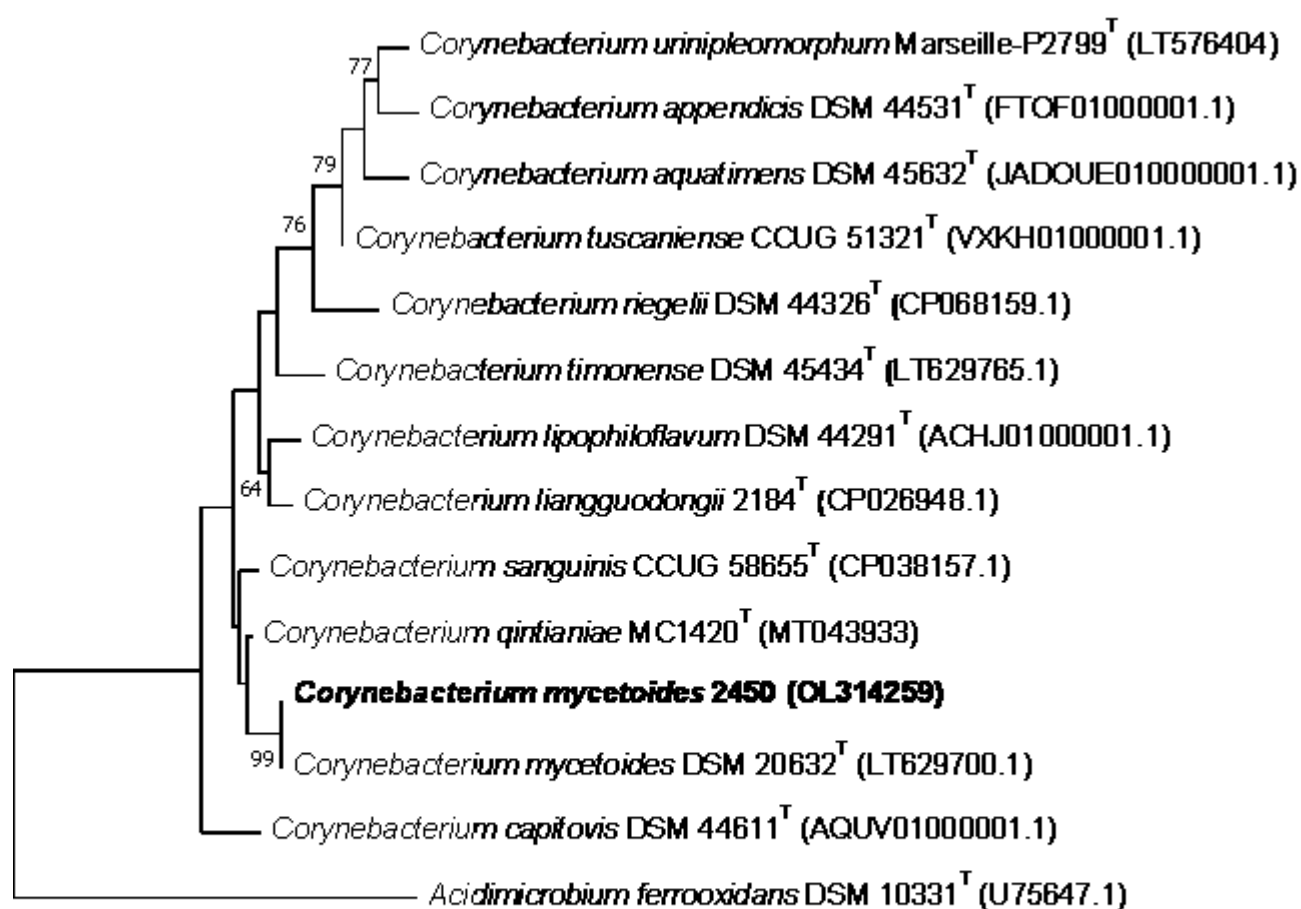
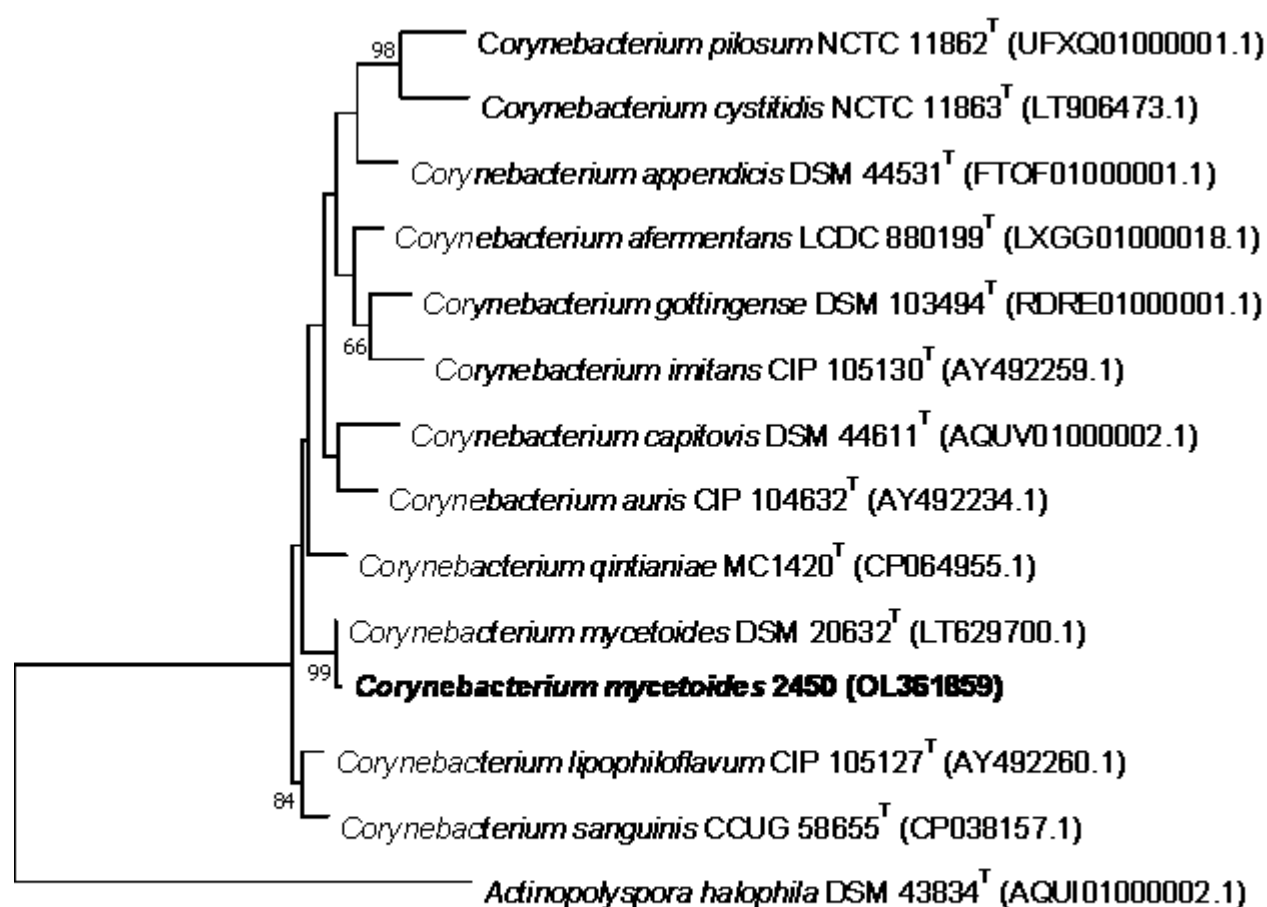
**Figure 1**

Figure 2



0.02C

Figure 3



0.10

Figure 4

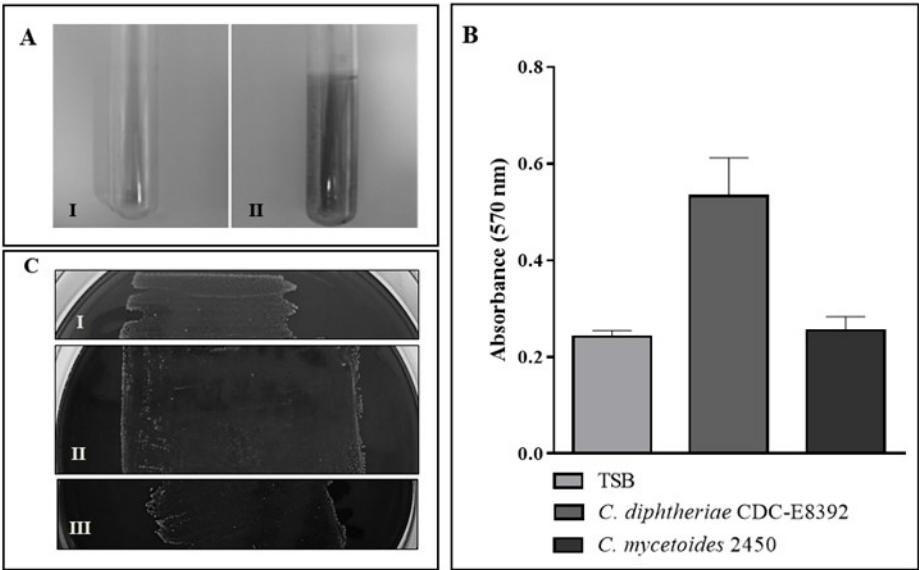


Figure 5

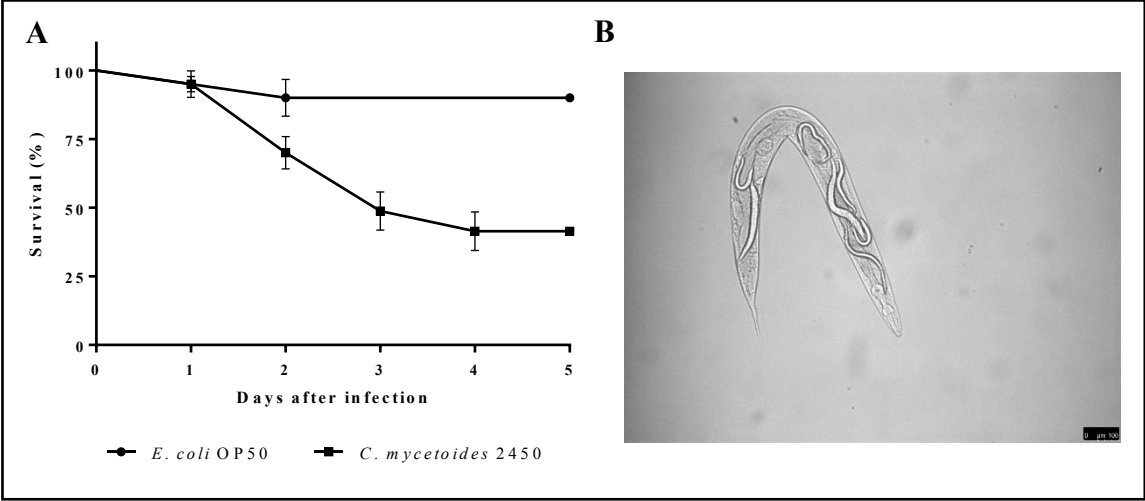


Figure 6

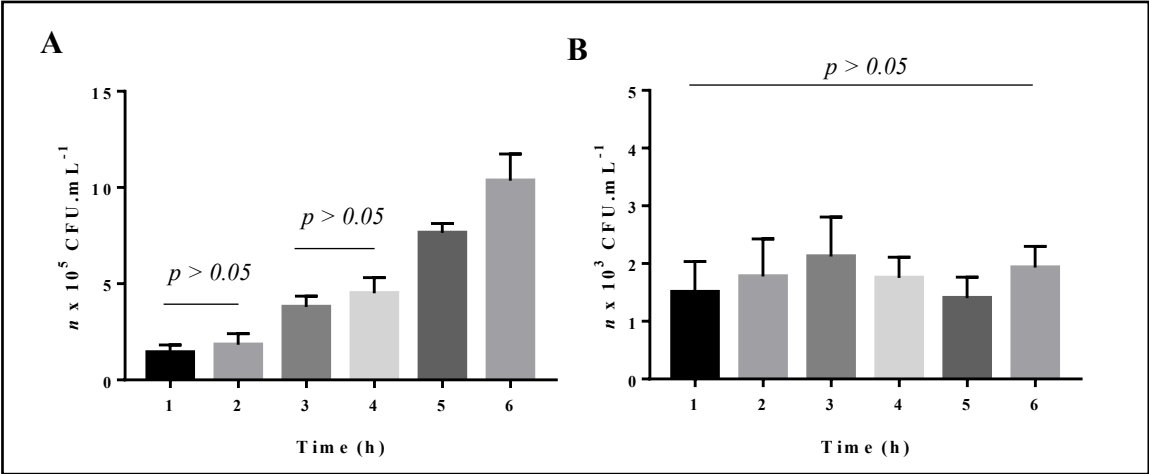


Tabela 1

**Table 1. Microbiological identification through different methods and antimicrobial susceptibility profile of *Corynebacterium mycetoides* clinical isolate recovered from urine culture of an elderly female patient.**

| Clinical isolate | Microbiological identification  |                                                 |                                                    |                                              | AST              |                               |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|-------------------------------|
|                  | Phenotypic identification tests |                                                 | Molecular identification methods                   |                                              | Resistance       | Susceptibility                |
|                  | Conventional                    | API Coryne (%)                                  | 16S rRNA/ <i>rpoB</i> sequencing (%)               | MALDI-TOF (score)                            |                  |                               |
| 2450             | <i>Corynebacterium</i> sp.      | <i>Corynebacterium argenteratense</i><br>(80.0) | <i>Corynebacterium mycetoides</i><br>(99.93/99.54) | <i>Corynebacterium mycetoides</i><br>(2.214) | PEN, CLI,<br>RIF | CIP, MFX,<br>VAN, LNZ,<br>TET |

AST, antimicrobial susceptibility test; PEN, benzylpenicillin; CLI, clindamycin; RIF, rifampicin; CIP, ciprofloxacin; MFX, moxifloxacin; VAN, vancomycin; LNZ, linezolid; TET, tetracycline

## 4 DISCUSSÃO

A aplicação cada vez maior de tecnologias de sequenciamento de última geração estimulou estudos de taxonomia com base em todo o genoma e tem mudado a compreensão do impacto clínico de algumas espécies de *Corynebacterium* que antes eram consideradas microorganismos oportunistas ou contaminantes de materiais clínicos. Diversas espécies emergiram como agentes causadores de infecções humanas nas últimas décadas, como *C. striatum* e *C. urealyticum*, ambas com alguns isolados apresentando fenótipo multirresistente (MCMULLEN et al., 2017a; NUDEL et al., 2018; ROCHA et al., 2020; SALEM et al., 2015).

Recentemente, com base em estudos taxonômicos, novas espécies foram descritas: *Corynebacterium fournieri*, *Corynebacterium gottingense*, *Corynebacterium urinipleomorphum*, *Corynebacterium sanguinis*, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium rouxii* e *Corynebacterium silvaticum*, estas três últimas espécies, atualmente são consideradas como pertencentes ao complexo difteria, juntamente com *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, e com isso também são consideradas como potencialmente produtoras da TD, uma vez que os estudos que deram origem às respectivas descrições taxonômicas foram realizados a partir das espécies *C. diphtheriae* (*C. belfantii* e *C. rouxii*) e *C. ulcerans* (*C. silvaticum*). Embora *C. sanguinis* tenha sido descrito no último ano, isolados têm sido recuperados de osso, ferida e sangue desde 1999 (ATASAYAR et al., 2017; BADELL et al., 2020; DAZAS et al., 2018; DIOP et al., 2018; JAÉN-LUCHORO et al., 2020).

A identificação bioquímica de *Corynebacterium* spp. permanece um desafio para os laboratórios de microbiologia clínica, já que a maioria dos isolados permanecem identificados apenas ao nível de gênero. Neste trabalho, seis isolados de *Corynebacterium* spp. foram recuperados de urina humana de indivíduos com problemas renais. Nenhum desses isolados foi identificado a nível de espécie devido à diversidade de espécies válidas e variedade de resultados fenotípicos. Ademais, mesmo com o uso do sistema comercial de identificação fenotípica semiautomatizado, não foi possível a identificação de espécie para nenhum dos seis isolados.

Estes resultados refletem o que diversos autores reportam acerca da identificação fenotípica, seja com o uso da identificação convencional ou com o uso de sistema semiautomatizado. De acordo com Adderson e colaboradores (2008) e Zasada e Mosiej (2018), os sistemas de identificação comercial não são confiáveis para a identificação

definitiva de corinebactérias. O estudo de Adderson e colaboradores (2008) analisou a identificação de *Corynebacterium* spp. por três sistemas de identificação comerciais, sendo eles: API® Coryne, sistema RapID™ CB PLUS e BBL™ Crystal™ Gram-Positive ID Kit, concluindo que, ainda que com algumas limitações, principalmente devido às falhas na identificação devido ao número de espécies contemplados no sistema em relação ao número de espécies válidas do gênero *Corynebacterium*, o sistema API® Coryne foi o sistema que obteve a maior sensibilidade na identificação.

Na última década, com o advento e o estabelecimento da espectrometria de massas MALDI-TOF MS nos laboratórios clínicos, a identificação de microorganismos tornou-se mais confiável e menos laboriosa, contribuindo para ampliar o espectro clínico de patógenos bacterianos emergentes e representando uma alternativa ao sequenciamento genético (PICHON et al., 2019; RYCHERT, 2019). Neste estudo, embora todos os isolados tenham sido identificados no nível de espécie pela técnica de MALDI-TOF MS, apenas dois apresentaram o *score* de identificação  $\geq 2.000$ , sendo este valor considerado pelo fabricante como identificação confiável a nível de gênero e provável identificação a nível de espécie. Estudos anteriores, que compararam a relação da identificação de *Corynebacterium* spp. por MALDI-TOF MS com a identificação através das análises da sequência do gene 16S rRNA, sugeriram que o valores de pontuação para identificação confiável no nível de espécie fosse reduzido para  $\geq 1.700$  (ALATOOM et al., 2012; BIZZINI et al., 2011). Considerando os resultados obtidos nestes estudos, os isolados de corinebactérias do presente trabalho teriam sido identificados de forma confiável pela espectrometria de massa MALDI-TOF MS.

Neste estudo, ao comparar a identificação fornecida pela espectrometria de massas com as análises moleculares realizadas, observou-se que cinco dos isolados de *Corynebacterium* foram identificados erroneamente como *C. aurimucosum* pela técnica de MALDI-TOF MS, incluindo um dos isolados que obteve o *score* de identificação confiável ( $\geq 2.000$ ). Embora a identificação através da técnica de MALDI-TOF MS seja promissora, o sistema também apresenta limitações, conforme foi observado por Rychert (2019), e, assim como API® Coryne não contempla em sua grade de identificação as espécies deste trabalho, o sistema MALDI-TOF MS também apresenta um banco de dados que, por vezes, não contempla todas as espécies de um determinado gênero ou pode confundir espécies filogeneticamente relacionadas. Neste estudo, por se tratar de espécies novas (discutidas adiante), portanto, não incluídas no banco de dados do sistema, os cinco isolados foram identificados como *C. aurimucosum*, a espécie do banco de dados do equipamento que compartilha maior similaridade. Por outro lado, o sistema MALDI-TOF MS permite a

inclusão de quaisquer perfis cromatográficos no banco de dados, o que contribui para ampliar a capacidade de identificação, conforme também observado por Rychert (2019). Portanto, uma atualização do banco de dados com perfis de espectros desta nova espécie pode fornecer futuramente a correta identificação por MALDI-TOF MS para os isolados destas espécies. Por outro lado, a espectrometria de massas mostrou-se eficiente na identificação de um dos isolados de *Corynebacterium*, a espécie rara *C. mycetoides*, neste sentido, Pichon e colaboradores (2019) já havia apontado o MALDI-TOF MS como um método de identificação eficiente para microorganismos incomuns, como também observado neste estudo.

O uso da análise da sequência do gene 16S rRNA facilitou significativamente a diferenciação de espécies de *Corynebacterium* ao longo de décadas com um valor similaridade limite estabelecido para o delineamento das espécies bacterianas de 98,70% (STACKEBRANDT; JONAS, 2006). Neste estudo, a identificação a nível de espécie de cinco isolados não foi possível com base na análise das sequências do gene 16S rRNA, uma vez que mostrou similaridade acima do ponto de corte estabelecido entre eles e as cepas tipo *C. aurimucosum* DSM 44532, para todos os isolados e para quatro isolados os valores de similaridade acima do ponto de corte também incluíam as cepas tipo *C. minutissimum* NCTC 10288 e *C. singulare* IBS B52218. Para o isolado identificado como *C. mycetoides* por MALDI-TOF MS, a identificação pela análise da similaridade do gene 16S rRNA obteve unicamente similaridade de 99,93% com a cepa tipo *C. mycetoides* DSM 20632. Os resultados obtidos para os isolados identificados como *C. aurimucosum* corroboram o estudo realizado por Khamis e colaboradores (2005) que aponta uma limitação do uso desta técnica para identificação de *Corynebacterium* spp. devido ao baixo polimorfismo do gene 16S rRNA, que para algumas espécies, como *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* e *Corynebacterium propinquum*, e *C. minutissimum* e *C. aurimucosum*, gera valores de similaridade acima dos pontos de corte aceitáveis quando comparadas entre si.

Khamis e colaboradores (2004) também propuseram a utilização do sequenciamento parcial do gene *rpoB* para substituir ou complementar as análises realizadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, com ponto de corte de 95% para a delimitação de espécie. Os resultados das análises das sequências parciais do gene *rpoB*, no presente trabalho, permitiram um direcionamento mais específico, confirmando como *C. mycetoides* um dos isolados (99,54%) e identificando como *C. aurimucosum* os outros cinco isolados que não haviam sido identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA com valores de similaridade acima do ponto de corte que variaram entre 96,18% e 97,14%. Entretanto, as

análises genômicas, realizadas posteriormente neste trabalho, revelaram que os cinco isolados identificados como *C. aurimucosum* correspondiam a duas novas espécies estreitamente relacionadas entre si e a espécie *C. aurimucosum*. Assim, considerando que o ponto de corte do gene *rpoB* para delinear espécies proposto por Khamis e colaboradores (2004) não foi suficiente para diferenciar as espécies novas da espécie *C. aurimucosum*, sugere-se a reavaliação do ponto de corte para a identificação de *Corynebacterium* spp. quando utilizada a análise da sequência parcial do gene *rpoB*.

No presente estudo, como observado pela exposição dos resultados acima, foram isoladas duas prováveis espécies novas de *Corynebacterium*. Para que essa hipótese pudesse ser confirmada, experimentos taxonômicos que são apresentados a seguir foram necessários. Os dados contidos no Artigo 1 mostram somente os resultados desses experimentos com uma das duas novas espécies descobertas que contemplam ao todo seis isolados, dos quais quatro fazem parte deste estudo. Os dois outros isolados pertencem ao grupo de pesquisa da Universidade de Buenos Aires, coordenado pelo Dr. Carlos Vay, que gentilmente aceitou a colaboração para realizarmos a descrição desta nova espécie. Os dados da outra espécie nova são contemplados no Artigo 2.

Diferentes genes podem indicar diferentes histórias evolutivas e geralmente não refletem a história filogenética. Isso é devido à possibilidade de aquisição de genes, seja através de transferência cruzada, mutação ou recombinações, observa Sant'Anna e colaboradores (2019). Neste trabalho, para ambas as espécies novas, observou-se que em contraste às análises da similaridade do gene 16S rRNA, a análise filogenética com base nas sequências do mesmo gene revelou um novo clado completamente uniforme e distinto, estreitamente relacionado à espécie *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>. Da mesma maneira, a análise filogenética do gene *rpoB* confirmou a separação mostrada tanto pelas análises de similaridade do próprio gene quanto pela análise filogenética do gene 16S rRNA, formando igualmente clado distinto dos isolados, os relacionando estreitamente com a espécie *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>. Entretanto, na análise do gene *rpoB*, é possível observar diferenças evolutivas entre os próprios isolados, ainda que pertencendo à mesma espécie. A confirmação dos resultados obtidos a partir das análises filogenéticas dos genes 16S rRNA e *rpoB* foi reafirmada pelo estudo filogenético realizado pela técnica de MLSA. A árvore resultante dessa análise mostrou que nossos isolados são distinguíveis das cepas tipo estreitamente relacionadas, apoiando a colocação filogenética dos isolados obtida pelas análises individuais dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

A importância de usar a comparação do genoma para o delineamento das espécies foi reconhecida há muito tempo. Desde 1987, o comitê *ad hoc* de Sistemática Bacteriana recomendou que a sequência completa de DNA deveria ser o padrão de referência para determinar a filogenia e por conseguinte deveria determinar a taxonomia (WAYNE, 1988). Ainda hoje, apesar das desvantagens, a DDH é considerada o padrão-ouro na taxonomia de procariotos, especialmente quando são encontradas similaridades nas análises do gene 16S rRNA acima de 97% (CHUN; RAINEY, 2014; TINDALL et al., 2010). Atualmente, com a vantagem da técnica de DDH digital, as análises se tornaram menos laboriosa e mais reprodutíveis.

Os valores da DDH digital entre as sequências dos genomas dos isolados e a espécie estreitamente relacionada *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> foram de 34,40 - 36,10%. As análises de DDH digital entre todos os isolados e a cepa referência *C. aurimucosum* ATCC 700975 também não alcançaram os pontos de corte necessários para que os isolados fossem considerados da mesma espécie. Para os outros quatros isolados que foram similares a *C. minutissimum* e *C. singulare*, quando os mesmos isolados foram comparados com *C. minutissimum* NCTC 10288<sup>T</sup> e *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup>, os valores de DDH digital variaram e não corresponderam ao limite proposto para se considerar como pertencente à mesma espécie para nenhuma das respectivas espécies. O limite considerado para a delimitação de espécies de procariotos utilizando a análise DDH digital é de > 70% (THOMPSON et al., 2013).

Em relação às análises médias de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados frente à cepa *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>, os isolados obtiveram valores entre 87,55 e 88,47% e 91,41 - 92,19%, respectivamente. Para a cepa referência *C. aurimucosum* ATCC 700975, os isolados mostraram valores de 89,20% (ANI) e 92,27% (AAI). Os pontos de corte propostos para a delimitação de espécie de ambas as análises são de 95% (THOMPSON et al., 2013). Na taxonomia polifásica de procariotos, a coesão genômica é tipicamente informada por medidas e métricas de similaridade, como DDH digital e ANI, que também se correlacionam em seus pontos de cortes (PALMER et al., 2020; SENTAUSA; FOURNIER, 2013). Os resultados deste estudo refletem a correlação dessas métricas, indicando que os isolados não atingiram os valores de corte necessários para serem considerados como pertencentes à espécie proposta anteriormente, *C. aurimucosum*. Resultados semelhantes para ANI e AAI também foram obtidos quando analisados os outros quatro isolados similares às espécies *C. minutissimum* e *C. singulare* frente às cepas tipo de *C. minutissimum* NCTC 10288<sup>T</sup> e *C. singulare* IBS B52218<sup>T</sup>.

Por fim, as superárvores forneceram evidências para as posições taxonômicas distintas dos isolados dentro do gênero *Corynebacterium* ao lado das espécies mais relacionadas. Estes resultados corroboram os resultados obtidos pelas análises filogenéticas realizadas com os genes 16S rRNA e *rpoB*, e pela MLSA, nas quais é possível observar a formação de clados distintos como os observados nas superárvores. Considerando todos os dados discutidos anteriormente, os microorganismos analisados neste estudo representam dois novos táxons do gênero *Corynebacterium*, que propusemos nomear *Corynebacterium guaraldiae* (Artigo 1) e *Corynebacterium hiratae* (Artigo 2) com os isolados 85 e 2274 como cepas tipo, respectivamente.

A cepa referência de *C. aurimucosum* ATCC 700975, até então identificada como *C. nigricans*, foi reclassificada por Daneshvar e colaboradores (2004) com base na hibridização DNA-DNA realizada de acordo com a técnica padrão-ouro para classificação taxonômica. Neste estudo, a hibridização entre a cepa tipo de *C. aurimucosum* NRRL B-24143 (= DSM 44532) e *C. nigricans* ATCC 700975 obtida foi de 97% na temperatura ótima (60°C). Diante desses resultados e obedecendo às regras taxonômicas vigentes, a cepa *C. nigricans* ATCC 700975 foi proposta como sinônimo (*pro synonym.*) de *C. aurimucosum*, deixando de ser cepa tipo de *C. nigricans* e passando a ser *C. aurimucosum*. Nesse sentido, utilizamos paralelamente a cepa referência *C. aurimucosum* ATCC 700975 para realizarmos as análises de taxonomia genômica conforme mostrado acima frente aos isolados deste estudo. Para tanto, e como forma de descartarmos possíveis equívocos, incluímos as cepas *C. aurimucosum* ATCC 700975 e *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> uma frente a outra para verificarmos os achados encontrados por Daneshvar e colaboradores (2004). Os resultados obtidos e mostrados no Artigo 2 deste estudo, contrapõem os resultados previamente mostrados através da técnica de DDH padrão-ouro realizada para propor a reclassificação taxonômica.

Em nossas análises observamos que a similaridade do gene 16S rRNA da cepa referência *C. aurimucosum* ATCC 700975 com a cepa tipo *C. aurimucosum* DSM 44532 é de 99,34%. A cepa referência também obteve similaridade acima do ponto de corte proposto frente a cepa tipo *C. singulare* IBS B52218, contudo previamente as análises de taxonomia genômica deste trabalho foram realizadas entre as cepas tipo utilizadas neste estudo e, embora existam particularidades nas análises de similaridade do gene 16S rRNA entre algumas delas, não existem relações taxonômicas entre elas quando realizadas análises filogenéticas e genômicas. Em relação à análise da similaridade da sequência parcial do gene *rpoB* entre as

cepas *C. aurimucosum* ATCC 700975 e *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>, o resultado obtido foi de 96,90%.

As análises filogenéticas de ambos os genes mostraram que os isolados analisados agrupam-se em clados distintos com considerável distância filogenética entre elas, contrapondo a análise de similaridade do gene 16S rRNA e corroborando os resultados obtidos na análise de similaridade do gene *rpoB*. Ambos os resultados filogenéticos são corroborados pela MLSA, conforme mostrado no Artigo 2, em que é possível observar a formação de um clado distinto e filogeneticamente distante da cepa tipo *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>.

Quando comparamos as cepas *C. aurimucosum* ATCC 700975 e *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> com as análises da taxonomia genômica, observamos que as cepas *C. aurimucosum* ATCC 700975 e *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> compartilham 50,30% de DDH digital, 92,53% (ANI) e 95,29% (AAI), sugerindo que a cepa *C. aurimucosum* ATCC 700975 não pertence a espécie *C. aurimucosum*. Até o momento, não podemos explicar o valor de AAI obtido entre as amostras *C. aurimucosum* ATCC 700975 e *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup>.

A análise da superárvore realizada entre as cepas *C. aurimucosum* ATCC 700975 e *C. aurimucosum* DSM 44532<sup>T</sup> concluem e corroboram os resultados encontrados nas análises filogenéticas e de taxonomia genômica. Além disso, distingue de maneira mais clara a posição taxonômica da cepa *C. aurimucosum* ATCC 700975 frente os isolados de *C. hiratae* sp. nov. e a cepa tipo *C. aurimucosum* DSM 44532.

Finalmente, após considerar todos os resultados discutidos acima, propomos a aplicação da regra 33c do Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana para que seja revivido o nome da cepa atualmente denominada *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975, tornando-se *Corynebacterium nigricans* (ex. Shukla et al., 2003) *nom. rev.*, com a cepa CN-1<sup>T</sup> (= ATCC 700975<sup>T</sup>; = CCUG 48176<sup>T</sup>, = CIP 107346<sup>T</sup>, = DSM 44827<sup>T</sup>, = JCM 12684<sup>T</sup>) como a cepa tipo.

Segundo Rychert (2019), o advento da espectrometria por MALDI-TOF MS trouxe uma vantagem na identificação de espécies incomuns ou raras. Neste estudo, foi apresentado o primeiro isolamento oriundo de urina humana de *Corynebacterium mycetoides*, uma espécie rara de *Corynebacterium*, que desde a década de sua descrição não havia sido reportado em nenhum caso infeccioso em humano.

*C. mycetoides* foi isolado pela primeira vez em 1942 por Castellani de culturas de úlceras tropicais que afetavam soldados nas regiões desérticas da África. Ao longo dos anos,

outros isolados (n = 5) também foram recuperados de úlceras tropicalóides em diferentes partes do mundo, como América Central, África, Espanha, Portugal, Itália e Extremo Oriente [34].

Até onde sabemos, relatamos o primeiro isolamento de *C. mycetoides* da urina humana recuperada de um paciente submetido a um transplante renal usando ciclosporina, um medicamento imunossupressor. Conforme observado em alguns estudos, o transplante foi descrito como um importante fator de risco para ITU causadas por espécies de corinebactérias, especialmente em circunstâncias imunocomprometidas (LÓPEZ-MEDRANO et al., 2008; ROBERT; ANNA; GRAŻYNA, 2018).

O isolado de *C. mycetoides* neste estudo possui características fenotípicas semelhantes às descritas em estudos anteriores (CAPOCACCIA; ORTALI, 1956; CAPOCACCIA; ORTALI; CAPONEBRAGA, 1957). Em relação à susceptibilidade a agentes antimicrobianos, Mungelluzzi e Caprilli (1965) relataram uma sensibilidade de *C. mycetoides* à estreptomicina e bacitracina, e resistência intermediária ao cloranfenicol, à penicilina e terramicina. No presente trabalho, o isolado de *C. mycetoides* exibiu resistência a três agentes antimicrobianos (benzilpenicilina, clindamicina e rifampicina), o que o caracteriza como um isolado MDR de acordo com os critérios propostos por Magiorakos e colaboradores (2012). Devido à falta de critérios para as análises dos antimicrobianos testados no estudo realizado por Mungelluzzi e colaboradores (1965), não foi possível realizar a comparação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos entre as cepas de *C. mycetoides* já reportadas e o isolado deste estudo.

Vários estudos relataram uma alta prevalência de resistência aos macrolídeos e às lincosamidas entre as espécies de *Corynebacterium* e destacaram a presença de enzimas metilase codificadas por genes da classe *ermX* como os principais mecanismos de resistência aos macrolídeos desses microorganismos (RAMOS et al., 2018; SZEMRAJ; KWASZEWSKA; SZEWCZYK, 2018). Por outro lado, o isolado *C. mycetoides* foi sensível à vancomicina e linezolida, corroborando relatos anteriores que demonstraram 100% de susceptibilidade dos isolados de corinebactéria à ambas as drogas (SALEM et al., 2015; SOKOL-LESZCZYNSKA et al., 2019). A vancomicina pode representar a opção terapêutica empírica para infecções graves, dependendo dos resultados dos testes de susceptibilidade, visto que a vancomicina é o tratamento de escolha para outras corinebactérias MDR (SALEM et al., 2015).

Desde o primeiro relato do isolamento de *C. mycetoides* em 1956, poucos estudos envolvendo esta espécie foram publicados na literatura e nenhum desses estudos investigou

seus mecanismos de virulência (CAPOCACCIA; ORTALI, 1956; CAPOCACCIA; ORTALI; CAPONEBRAGA, 1957; MUNGELLUZZI; CAPRILLI, 1965).

Estruturas de biofilme por *Corynebacterium* spp. foram encontrados em vários dispositivos médicos, como cateteres urinários e cateteres venosos centrais, entre outros (DE SOUZA et al., 2015). O isolado de *C. mycetoides*, embora incapaz de aderir às superfícies de poliestireno e vidro, foi capaz de aderir significativamente às superfícies de cateteres de látex, silicone e poliuretano, destacando uma característica de virulência relevante, principalmente no ambiente nosocomial, onde é comum a utilização de cateteres urinários de silicone e látex para auxiliar no diagnóstico e tratamento de vários processos patológicos (LENZ, 2006).

A colonização das superfícies mucosas depende da capacidade da bactéria de aderir às células epiteliais. Portanto, a capacidade de aderir e sobreviver dentro de vários tipos de células pode fornecer vantagens ao microorganismo no estabelecimento do processo infeccioso. Alguns estudos relataram a capacidade de diferentes espécies de *Corynebacterium* em aderir e sobreviver em células epiteliais (HIRATA et al., 2004; OTT, 2018). As células epiteliais Vero são consideradas um bom modelo para avaliar a interação hospedeiro-bactéria no trato urinário (ANANIAS; YANO, 2008; CORDEIRO et al., 2016). O isolado clínico *C. mycetoides* foi capaz de aderir às células Vero, e bactérias intracelulares viáveis foram encontradas nas condições testadas, sugerindo que *C. mycetoides* apresenta atributos de virulência que os torna capazes de colonizar células epiteliais do trato urinário favorecendo sua manutenção e até mesmo o desenvolvimento de infecção nesse nicho. Vários fatores podem contribuir para a adesão aos tecidos humanos. Para *C. diphtheriae*, várias proteínas de superfície foram identificadas, entre outros fatores, envolvidas neste processo (OTT, 2018). Para *C. mycetoides*, entretanto, os fatores que contribuem para a interação de com células epiteliais, como a expressão de proteínas de superfície relacionadas à adesão, bem como outros mecanismos de interação, ainda não foram descritos.

Os modelos *in vivo* têm sido amplamente utilizados para estudos de virulência bacteriana. O nematoide *Caenorhabditis elegans* tem sido usado como um hospedeiro modelo para investigar os mecanismos patogênicos de vários patógenos humanos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo espécies de *Corynebacterium* (ANTUNES et al., 2016; OTT et al., 2012). Antunes e colaboradores (2016) avaliaram a influência de espécies inofensivas e nocivas de *Corynebacterium* infectando o nematoide com *Corynebacterium glutamicum* não patogênico, e as espécies potencialmente toxigênicas *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*. Neste estudo, foi observado que a taxa de mortalidade de *C. elegans* quando infectado com *C. glutamicum* era significativamente menor (20%) que quando comparada com a infecção por

*C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (taxas de mortalidade de 70% e 90%, respectivamente). Posteriormente, resultados semelhantes foram encontrados comparando isolados clínicos de *C. striatum* com diferentes níveis de patogenicidade (SOUZA et al., 2019). No presente estudo, a infecção de *C. elegans* com *C. mycetoides* reduziu significativamente a sobrevivência do nematoide, apresentando também uma alta taxa de mortalidade (cerca de 60%) como também observado nos estudos mencionados acima.

O efeito *bagging* e a formação de *star* são fenômenos induzidos em *C. elegans* por mecanismos distintos que levam a mudanças morfológicas no nematoide. A eclosão interna de ovos em *C. elegans* ou “*worm bagging*” é induzida como uma resposta a algum tipo de estresse, como exposição a bactérias patogênicas, para proteger seus ovos do ambiente hostil (ANTUNES et al., 2016; MOSSER; MATIC; LEROY, 2011). A formação de *star* é uma alteração morfológica induzida pela colonização da superfície do verme por algumas espécies patogênicas, como *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *Leucobacter* sp. (ANTUNES et al., 2015; HODGKIN et al., 2013). Acredita-se que esses agregados impeçam a fuga dos nematoides, levando-os à morte. Suas carcaças serviriam então como fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano. Recentemente, a formação de *star*, inicialmente incluída entre as alterações morfológicas para bactérias patogênicas, foi observada tanto com patogênicas quanto não patogênicas (ANTUNES et al., 2016). Souza e colaboradores (2019) demonstraram que, para *C. striatum*, a indução de *star* foi detectada apenas nas cepas que levaram a 100% de mortalidade nos vermes (3 dias pós-infecção). Conforme relatado para *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. striatum*, o isolado deste estudo de *C. mycetoides* também foi capaz de levar a mudanças morfológicas no verme induzindo o efeito *bagging* e a formação de *star*, sugerindo que o isolado *C. mycetoides* é potencialmente virulento para *C. elegans*.

Os resultados deste estudo sugerem que *C. mycetoides* possui alguns atributos de virulência que podem favorecer o estabelecimento da doença, especialmente em determinadas circunstâncias como uso de cateter e imunocomprometimento. Novamente, foram encontrados achados significativos para que o negligenciamento de isolados puros de *Corynebacterium* spp. não seja mais uma prática realizada entre microbiologistas e médicos, especialmente quando se tratar de isolados oriundos de pacientes hospitalizados e imunocomprometido.

## CONCLUSÕES

A caracterização fenotípica e molecular, as análises taxonômicas e a investigação de mecanismos bacterianos de virulência realizados neste estudo permitiram concluir que:

- a) conforme demonstrado em estudos realizadas anteriormente, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa, a identificação a nível de espécie no gênero *Corynebacterium* pode não ser possível através das metodologias convencionais e pelo sistema semiautomatizado API® Coryne, já que os seis isolados de *Corynebacterium* estudados, oriundos de urina humana, não puderam ser identificados por estes métodos;
- b) a técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF MS permanece uma ferramenta útil para a identificação de espécies raras ou incomuns, uma vez que permitiu a identificação do isolado raro *C. mycetoides* corretamente. Entretanto, considerando os parâmetros propostos para identificação de espécies de *Corynebacterium* apresentado neste estudo, o sistema MALDI-TOF MS não foi capaz de identificar as espécies novas, uma vez que, dentre os seis isolados clínicos de *Corynebacterium*, cinco foram identificados erroneamente;
- c) embora as análises de similaridade das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* tenham corroborado a identificação fornecida pelo sistema MALDI-TOF MS para a espécie rara, *C. mycetoides*, algumas espécies de *Corynebacterium* spp., como as duas descritas no presente estudo, não puderam ser diferenciadas por esta metodologia, à semelhança do observado previamente para algumas espécies do gênero intimamente relacionadas;
- d) os genomas completos dos cinco isolados de espécies novas de *Corynebacterium* deste estudo foram depositados no repositório de acesso público GenBank;
- e) a aplicação da abordagem polifásica para estudo taxonômico dos isolados clínicos pode ser uma estratégia eficaz na diferenciação de espécies intimamente relacionadas de *Corynebacterium*, pois cinco dos isolados puderam ser diferenciados das demais espécies de *Corynebacterium*, compondo duas novas espécies, cujos nomes propostos na descrição foram *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov. e *Corynebacterium hiratae* sp. nov.. Além disso, esta abordagem foi também valiosa para confirmação da identificação molecular do isolado raro, *C. mycetoides*;
- f) embora algumas espécies deste gênero sejam raramente reportadas na literatura e tenham seu potencial patogênico não determinado, seus isolados clínicos devem ser considerados,

adequadamente identificados e investigados quanto ao seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, pois, assim como o isolado clínico brasileiro de *C. mycetoides* mostrou-se multirresistente, capaz de aderir às superfícies de cateter de poliuretano, silicone e látex, dispositivos utilizados comumente no ambiente hospitalar, bem como de aderir e se manter viável no compartimento intracelular de células epiteliais renais, e de apresentar alto índice de letalidade no nematoide *C. elegans*, outras espécies do gênero podem apresentar estas habilidades e causar processos infecciosos importantes.

Deste modo, embora as técnicas moleculares de identificação microbiológica atualmente disponíveis nos laboratórios clínicos forneçam dados mais confiáveis e rápidos que os métodos bioquímicos convencionais, e sejam eficazes na identificação de espécies raras e incomuns, apresentam limitações, não diferenciando espécies intimamente relacionadas de *Corynebacterium* e/ou não sinalizando o aparecimento de novas espécies. Já as ferramentas de bioinformática aplicadas às análises taxonômicas mostraram compor uma abordagem eficaz para o delineamento de novas espécies, fornecendo, assim, novos dados acerca da grande diversidade entre os membros do gênero *Corynebacterium*. Por fim, o estudo de espécies de *Corynebacterium* isoladas de infecções em humanos, como *C. mycetoides*, deve ser encorajado, uma vez o conhecimento dos mecanismos de virulência, dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e da diversidade microbiana em circulação permitirá a elaboração de protocolos baseados em evidências para a prevenção e tratamento das diversas infecções, seja no ambiente hospitalar ou na comunidade.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, P. et al. Encefalopatia hiperamoniêmica secundaria a infección urinaria por germen productor de ureasa. Caso clínico pediátrico. *Archivos argentinos de pediatría*, v. 115, n. 6, p. e454-e457, 2017.
- ADDERSON, E. E. et al. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 921-927, 2008.
- ADDERSON, E. E.; BOUDREAUX, J. W.; HAYDEN, R. T. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, n. 2, p. 136-141, 2008.
- AHMAD, N. M.; AHMAD, K. M. *Corynebacterium minutissimum* pyelonephritis with associated bacteraemia: a case report and review of literature. *The Journal of infection*, v. 51, n. 5, p. e299-303, dez. 2005.
- ALATOOM, A. A. et al. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, v. 50, n. 1, p. 160-163, jan. 2012.
- ALIBI, S. et al. Virulence of clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces. *Microbial pathogenesis*, v. 155, p. 104887, jun. 2021.
- ALIBI, S. et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.
- ALIBI, S. et al. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathologie-biologie*, v. 63, n. 4-5, p. 153-157, set. 2015.
- AMMENTI, A. et al. Updated italian recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of the first febrile urinary tract infection in young children. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway: 1992), v. 109, n. 2, p. 236-247, fev. 2020.
- ANANIAS, M; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian journal of medical and biological research* = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas, v. 41, n. 10, p. 877-883, out. 2008.
- ANTUNES, C. A. et al. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria. *Microbiology* (Reading, England), v. 162, n. 1, p. 84-93, jan. 2016.
- ANTUNES, C. A. et al. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology* (United Kingdom), v. 161, n. 3, p. 639-647, 2015.
- ANVISA. *Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde*, v. 1, p. 44, 2013.

- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. *The Brazilian journal of infectious diseases*: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, v. 12, n. 6, p. 526-530, dez. 2008.
- APERIS, G.; MOYSSAKIS, I. *Corynebacterium minutissimum* endocarditis: a case report and review. *The Journal of infection*, v. 54, n. 2, p. e79-81, fev. 2007.
- ARAGÓN, I. M. et al. The urinary tract microbiome in health and disease. *European urology focus*, v. 4, n. 1, p. 128-138, jan. 2018.
- ASADI KARAM, M. R.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Urinary tract infection: pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*, v. 108, n. 69, p. 56-67, 2019.
- ATASAYAR, E. et al. *Corynebacterium gottingense* sp. nov., isolated from a clinical patient. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 67, n. 11, p. 4494-4499, nov. 2017.
- AYGUN, G. et al. A fatal case of urosepsis due to *Corynebacterium riegelii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 475-476, 2013.
- BADELL, E. et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Research in microbiology*, v. 171, n. 3-4, p. 122-127, 2020.
- BAIO, P. V. P. et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013.
- BARBERIS, C. M. et al. *Corynebacterium phoceense* – a rare *Corynebacterium* species isolated from a urine sample. *Access Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2021.
- BARBERIS, C. M. et al. Total nephrectomy following *Corynebacterium coyleae* urinary tract infection. *JMM Case Reports*, v. 5, n. 9, p. 0-3, 2018.
- BARBERIS, C. M. et al. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 1-6, 2014.
- BATEY, R. G. Aspects of pathogenesis in a mouse model of infection by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *The Australian journal of experimental biology and medical science*, v. 64 (Pt 3), p. 237-249, jun. 1986.
- BAYRAK, O. et al. Is single-dose fosfomycin trometamol a good alternative for asymptomatic bacteriuria in the second trimester of pregnancy? *International urogynecology journal and pelvic floor dysfunction*, v. 18, n. 5, p. 525-529, maio 2007.
- BECHARA, C. et al. *Corynebacterium jeikeium* pacemaker infection associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies: a single positive blood culture could be sufficient for diagnosis. *Journal of medical microbiology*, v. 60, n. Pt 2, p. 249-251, fev. 2011.
- BECKFORD-BALL, J. Management of suspected bacterial urinary tract infection. *Nursing times*, v. 102, n. 36, p. 25-26, 2006.

- BELMARES, J. et al. *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. *BMC infectious diseases*, v. 7, p. 4, fev. 2007.
- BERGIN, I. L. et al. Isolation and characterization of *Corynebacterium ulcerans* from cephalic implants in macaques. *Comparative medicine*, v. 50, n. 5, p. 530-535, out. 2000.
- BERNARD, K. A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. [S.l: s.n.], 2012.
- BERNARD, K. A.; FUNKE, G. *Corynebacterium*. [S.l: s.n.], 2015.
- BERNIER, A. M.; BERNARD, K. A. Draft genome sequence for the type strain of *Corynebacterium afermentans* LCDC 88-0199T, isolated from a human blood culture. *Genome Announcements*, v. 4, n. 4, p. 10-11, 2016.
- BERTUCCINI, L.; BALDASSARRI, L.; VON HUNOLSTEIN, C. Internalization of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 37, n. 3, p. 111-118, 2004.
- BILLARD-POMARES, T. et al. Diagnosis in france of a non-toxigenic tox gene-bearing strain of *Corynebacterium diphtheriae* in a young male back from Senegal. *Open forum infectious diseases*, v. 4, n. 1, p. ofw271, 2017.
- BININDA-EMONDS, O. R. P. The evolution of supertrees. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 19, n. 6, p. 315-322, 2004.
- BIZZINI, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 2, p. 693-696, fev. 2011.
- BLÄCKBERG, A. et al. Infective endocarditis due to *Corynebacterium* species: clinical features and antibiotic resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, p. 1-6, 2021.
- BONMARIN, I. et al. Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*, v. 27, n. 31, p. 4196-4200, 2009.
- BORDE, K. et al. Not always a commensal: a case of mastitis by *Corynebacterium amycolatum*. *IDCases*. [S.l: s.n.], 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. *Nota informativa nº 9/2019-CGDT/DEVIT/SVS/MS*. Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Portaria nº 64*, de 11 de dezembro de 2018. Brasília, 2018.
- BROADWAY, M. M. et al. Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *Journal of bacteriology*, v. 195, n. 16, p. 3774-3783, ago. 2013.
- BURKOVSKI, A. Diphtheria and its etiological agents. *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 1-14.

BURKOVSKI, A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *ISRN microbiology*, v. 2013, p. 935736, 2013.

CAMELLO, T. C. F. et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. *Letters in Applied Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 458-464, 2009.

CAMELLO, T. C. F. et al. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 39-44, 2003.

CAMPANILE, F. et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p. 75-78, 2009.

CAPOCACCIA, L; ORTALI, V. A new species of *Corynebacterium*: the *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali and Capocaccia 1956. *Rendiconti - Istituto superiore di sanita*, v. 19, n. 6, p. 480-491, 1956.

CAPOCACCIA, L; ORTALI, V; CAPONEBRAGA, P. Serological reports and antibiogram of *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali and Capocaccia 1956. *Rendiconti - Istituto superiore di sanita*, v. 20, n. 9-10, p. 860-864, 1957.

CARVALHO, R. V. et al. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 22, n. 4, p. 347-351, 2018.

CHAO, C. T.; HUANG, J. W.; YEN, C. J. A rare and under-recognized pathogen in peritoneal dialysis peritonitis: *Corynebacterium jeikeium*. *Peritoneal dialysis international: journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. [S.l: s.n.], 2013.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, v. 22, n. 6, p. 996-1006, dez. 1985.

CHU, C. M.; LOWDER, J. L. Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 219, n. 1, p. 40-51, jul. 2018.

CHUN, J. et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 461-466, 2018.

CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the bacteria and archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 316-324, 2014.

CLARKE, J. D.; ABDUR RAHMAN, M.; SAUL, Z. A case of recurrent *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: unanswered questions for the treatment of chronic endovascular infections. *IDCases*, v. 18, p. e00610, 2019.

COENYE, T. et al. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, n. 2, p. 147-167, 2005.

COLGAN, R.; WILLIAMS, M. Diagnosis and treatment of acute uncomplicated cystitis. *American Family Physician*, v. 84, n. 7, p. 771-776, 2011.

COLLINS, M. D. *Corynebacterium mycetoides* sp. nov., nom. rev. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, v. 3, n. 3, p. 399-400, 1982.

COLLINS, M. D.; BURTON, R. A.; JONES, D. *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiology Letters*, v. 49, n. 3, p. 349-352, 1 mar. 1988.

COLLINS, M. D.; JONES, D. *Corynebacterium minutissimum* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 33, n. 4, p. 870-871, 1 out. 1983.

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

CORDEIRO, M. A. et al. Curli fimbria: an Escherichia coli adhesin associated with human cystitis. *Brazilian journal of microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 414-416, 2016.

CORTES-PENFIELD, N. W.; TRAUTNER, B. W.; JUMP, R. L. P. Urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria in older adults. *Infectious disease clinics of North America*, v. 31, n. 4, p. 673-688, dez. 2017.

COSTA, L. F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002.

CRESCI, M. et al. *Corynebacterium phoceense* sp. nov., strain MC1(T) a new bacterial species isolated from human urine. *New microbes and new infections*, v. 14, p. 73-82, nov. 2016.

CRUM-CIANFLONE, N. F.; BALLON-LANDA, G.; ZORN, G. Photo Quiz. Recurrent breast abscess in a 33-year-old woman. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 59, n. 3, p. 410; 454-5, ago. 2014.

CURRY, C. R. et al. Encrusted cystitis secondary to *Corynebacterium glucuronolyticum* in a 57-year-old man without predisposing factors. *Laboratory Medicine*, v. 46, n. 2, p. 136-139, 2015.

DA ROCHA, J. A. et al. Early prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum*: the first case reported in Brazil. *Journal of infection in developing countries*, v. 12, n. 9, p. 806-807, set. 2018.

DA SILVA TRENTIN, D.; BRANDT GIORDANI, R.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

DALAL, A.; LIKHI, R. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. *The Journal of infection*, v. 56, n. 1, p. 77-79, jan. 2008.

- DANESHVAR, M. I. et al. Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium aumucosum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p. 4189-4198, 2004.
- DAZAS, M. et al. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 68, n. 12, p. 3826-3831, dez. 2018.
- DE MIGUEL, I.; RODRÍGUEZ, E.; MARTÍN, A. M. *Corynebacterium amycolatum*: sepsis in hematologic patients. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, v. 17, n. 7, p. 340-341, 1999.
- DE SANTIS, A. et al. Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infective endocarditis with embolic events: a case report. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 1-5, 2020.
- DE SOUZA, C. et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 2, p. 242-248, 2015.
- DE ZOYSA, A. et al. Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4377-4381, 2005.
- DEVRIESE, L. A. et al. Identification of *Corynebacterium glucuronolyticum* strains from the urogenital tract of humans and pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 12, p. 4657-4659, 2000.
- DIAS, A. A. S. O. et al. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 8, p. 743-748, 2010.
- DIOP, K. et al. *Corynebacterium furnierii* sp. nov., isolated from the female genital tract of a patient with bacterial vaginosis. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, n. 7, p. 1165-1174, jul. 2018.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, abr. 2002.
- DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary research*, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.
- DOS SANTOS, C. S. et al. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiology and immunology*, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2010.
- DOS SANTOS, L. S. et al. Tellurite resistance: a putative pitfall in *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2015.

DOWLING, W. B.; KOEN, J. *Corynebacterium jeikeium* native valve infective endocarditis case report: a confirmed microbiological and pathological diagnosis from heart valvular tissue. *European heart journal. Case reports*, v. 4, n. 6, p. 1-4, dez. 2020.

DYKHUIZEN, R. S. et al. *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: multiple abscess formation in brain and liver. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, n. 6, p. 637-639, 1995.

EISENBERG, T. et al. Nontoxigenic tox-bearing *Corynebacterium ulcerans* infection among game animals, Germany. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 3, p. 448-452, mar. 2014.

ESKANDAR, S. et al. Draft genome sequence of *Corynebacterium aurimucosum* UMB7769, isolated from the female urinary tract. *Microbiology resource announcements*, v. 9, n. 22, maio 2020.

ESTEBAN, J. et al. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, v. 18, n. 7, p. 518-521, jul. 1999.

FARRELL, M.; DEMPSEY, J. *Smeltzer & Bare's textbook of medical-surgical nursing*. Third ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2014.

FERNÁNDEZ-NATAL, M. I. et al. The isolation of *Corynebacterium coyleae* from clinical samples: clinical and microbiological data. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, n. 3, p. 177-184, 2008.

FERNANDEZ-PITTOL, M. et al. Skin infection by *Corynebacterium diphtheriae* and *Streptococcus pyogenes*: an unusual association. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (English ed.). [S.l.: s.n.], dez. 2019.

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

FERNÁNDEZ GUERRERO, M. L. et al. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* endocarditis successfully treated with daptomycin. *International journal of antimicrobial agents*. Netherlands: [s.n.], out. 2012.

FESSLER, A. T.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium* spp., and *Trueperella pyogenes*. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 6, 2017.

FLORES-MIRELES, A.; HREHA, T. N.; HUNSTAD, D. A. Pathophysiology, Treatment and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Topics in spinal cord injury rehabilitation*, v. 25, n. 3, p. 228-240, 2019.

FUCHS, F. et al. *Diphtheriae* – Associated Genital Ulceration. v. 26, n. 9, p. 9-10, 2020.

FUNKE, G. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical microbiology reviews*, v. 10, n. 1, p. 125-159, jan. 1997.

- FUNKE, G. et al. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 5, p. 1124-1128, 1996.
- FUNKE, G.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D. *Corynebacterium riegelii* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 624-627, 1998.
- GALAN-SANCHEZ, F. et al. Urethritis due to *Corynebacterium glucuronolyticum*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 17, n. 5, p. 720-721, 2011.
- GALAZKA, A. M.; ROBERTSON, S. E. Immunization against diphtheria with special emphasis on immunization of adults. *Vaccine*, v. 14, n. 9, p. 845-857, 1996.
- GAO, X. L. et al. Airborne bacterial contaminations in typical chinese wet market with live poultry trade. *Science of the Total Environment*, v. 572, p. 681-687, 2016.
- GASPAR, A. H.; TON-THAT, H. Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 4, p. 1526-1533, fev. 2006.
- GHERARDI, G. et al. *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract infection: case report and review of the literature. *IDCases*, v. 2, n. 2, p. 56-58, 2015.
- GILBERT, R., Stewart F. C. *Corynebacterium ulcerans*: a pathogenic microorganism resembling *C. diphtheriae*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 12, p. 756-61, 1926.
- GOMES, D. L. R. et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 1419-1427, 2009.
- GONZÁLEZ-CHAMORRO, F. et al. Urinary tract infections and their prevention. *Actas Urológicas Españolas*, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2012.
- GUIMARAES, L. C. et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium urealyticum* strain DSM 7111, isolated from a 9-year-old patient with alkaline-encrusted cystitis. *Genome Announcements*, v. 1, n. 3, p. 2008-2009, 2013.
- GUPTA, K. et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 5, p. 103-120, 2011.
- GUPTA, K.; GRIGORYAN, L.; TRAUTNER, B. In the clinic urinary tract infection. *Annals of Internal Medicine*, v. 167, n. 7, p. ITC49-ITC64, 2017.
- HAHN, W. O. et al. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* associated with increased use of parenteral antimicrobial drugs. *Emerging infectious diseases*, v. 22, n. 11, p. 1908-1914, nov. 2016.
- HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infection and immunity*, v. 12, n. 6, p. 1439-1449, dez. 1975.

- HAUSER, D. et al. Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains: correlation with ADP-ribosylation activity assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 10, p. 2720-2723, 1993.
- HIRATA, R. Jr. et al. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbial pathogenesis*, v. 36, n. 3, p. 125-130, mar. 2004.
- HOCANOĞLU, M. et al. Maternal ventriculoperitoneal shunt infection due to *Corynebacterium xerosis* following caesarean section. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 39, n. 3, p. 400-402, 2019.
- HODGKIN, J. et al. Two *Leucobacter* strains exert complementary virulence on *Caenorhabditis* including death by worm-star formation. *Current biology: CB*, v. 23, n. 21, p. 2157-2161, nov. 2013.
- HOLMES, R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *The Journal of infectious diseases*, v. 181 Suppl, p. S156-67, fev. 2000.
- HUGENHOLTZ, P. et al. Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *ISME Journal*, v. 15, n. 7, p. 1879-1892, 2021.
- JACKMAN, P. J. H. et al. Classification of corynebacteria associated with endocarditis (group JK) as *Corynebacterium jeikeium* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 83-90, 1987.
- JAÉN-LUCHORO, D. et al. *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and environmental associated *Corynebacterium*. *Systematic and applied microbiology*, v. 43, n. 1, p. 126039, jan. 2020.
- JORGENSEN, I.; SEED, P. C. How to make it in the urinary tract: a tutorial by *Escherichia coli*. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 10, p. e1002907, 4 out. 2012.
- KALT, F. et al. *Corynebacterium* species rarely cause orthopedic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 12, p. 1-8, 2018.
- KAMMOUN, M. M. et al. *Corynebacterium striatum* meningitis. *Medecine et maladies infectieuses*. France: [s.n.], dez. 2016.
- KATES, O.; STARR, K.; BOURASSA, L. Closing the brief case: nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in a nonhealing wound. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 58, n. 12, p. 1-5, 2020.
- KHAMIS, A.; RAOULT, D.; SCOLA, B. L. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. v. 43, n. 4, p. 1934-1936, 2005.
- KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 9, p. 3925-3931, set. 2004.

KHARE, B.; NARAYANA, S. V. L. Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria: Roles of sortases and implications for assembly. *Protein Science*, v. 26, n. 8, p. 1458-1473, 2017.

KIM, S. et al. Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of biochemistry*, v. 147, n. 4, p. 523-533, abr. 2010.

KIMURA, S. et al. Clinical characteristics and predictive factors for mortality in coryneform bacteria bloodstream infection in hematological patients. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 23, n. 3, p. 148-153, mar. 2017.

KISHORE, C. K. et al. Gangrene and bacteremia due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient on maintenance hemodialysis. *Indian journal of nephrology*, v. 25, n. 5, p. 317-318, 2015.

KLEIN, R. D.; HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature reviews microbiology*, v. 18, n. 4, p. 211-226, abr. 2020.

KLINE, K. A; LEWIS, A. L. Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 2, abr. 2016.

KONINGSTEIN, M. et al. Recommendations for the empirical treatment of complicated urinary tract infections using surveillance data on antimicrobial resistance in the Netherlands. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, 2014.

KUMARI, P. et al. *Corynebacterium afermentans* spp. *afermentans* sepsis in a neurosurgical patient. *The Journal of infection*, v. 35, n. 2, p. 201-202, 1997.

KURIA, J. K.; HOLSTAD, G. Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep-correlation between the hemolysis inhibition test and the ELISA test. *Acta veterinaria Scandinavica*, v. 30, n. 1, p. 109-110, 1989.

LALA, V.; MINTER, D. A. Acute Cystitis. *Treasure Island (FL): [s.n.]*, 2021..

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

LEE, J. Y.; LEE, S. H.; KIM, W. H. Three-valve endocarditis caused by *Corynebacterium striatum*. *Korean Circulation Journal*, v. 48, n. 9, p. 861-862, 2018.

LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. *Atlas und grundriss der bakteriologie und lehrbuch der speciellen bacteriologischen diagnostik*. Munich: J. F. Lehmann, 1896.

LENZ, L. L. Cateterismo vesical: cuidados, complicações e medidas preventivas. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v. 35, p. 82-91, 2006.

- LO, S. et al. Urinary tract infection with *Corynebacterium aurimucosum* after urethroplasty stricture of the urethra: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2015.
- LÓPEZ, A. B. et al. Cistitis y hematuria por *Corynebacterium striatum*. A propósito de un caso y revisión de la literatura científica. *Actas Urológicas Españolas*, v. 33, n. 8, p. 909-912, 2009.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ GILA, J. D. et al. *Corynebacterium jeikeium* urinary tract infection and good clinical response with nitrofurantoin treatment. *Revista española de quimioterapia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*. [S.l: s.n.], fev. 2019.
- LÓPEZ-MEDRANO, F. et al. Urinary tract infection due to *Corynebacterium urealyticum* in kidney transplant recipients: an underdiagnosed etiology for obstructive uropathy and graft dysfunction-results of a prospective cohort study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of America*, v. 46, n. 6, p. 825-830, mar. 2008.
- MAGIORAKOS, A-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 268-281, mar. 2012.
- MAGISTRO, G.; STIEF, C. G. The urinary tract microbiome: the answer to all our open questions? *European urology focus*, v. 5, n. 1, p. 36-38, jan. 2019.
- MAHATO, N. K. et al. Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. Antonie van Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 110, n. 10, p. 1357-1371, 2017.
- MAHESWARI, U. B. et al. Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Indian journal of urology*, v. 29, n. 4, p. 277-281, out. 2013.
- MANCINI, F. et al. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 73, n. 2, p. 111-120, jun. 2012.
- MANDLIK, A. et al. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Molecular microbiology*, v. 64, n. 1, p. 111-124, abr. 2007.
- MARRIE, T. J.; COSTERTON, J. W. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *Journal of clinical microbiology*, v. 19, n. 5, p. 687-693, maio 1984.
- MARTINS, C. A. S. et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 6, p. 905-913, 2009.
- MATSUNAMI, M. et al. Urosepsis caused by *Globicatella sanguinis* and *Corynebacterium riegelii* in an adult: case report and literature review. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 18, n. 4, p. 552-554, ago. 2012.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; DUARTE FORMIGA, L. C.; PEREIRA, G. A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes and infection*, v. 2, n. 12, p. 1507-1512, out. 2000.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C.; ANDRADE, A. F. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current microbiology*, v. 38, n. 1, p. 37-42, jan. 1999.

MAUREY, C. et al. Clinical description of *Corynebacterium urealyticum* urinary tract infections in 11 dogs and 10 cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 60, n. 4, p. 239-246, 2019.

MCCONNELL, S. A. et al. Protein labeling via a specific lysine-isopeptide bond using the pilin polymerizing sortase from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 27, p. 8420-8423, jul. 2018.

MCLELLAN, L. K.; HUNSTAD, D. A. Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. *Trends in Molecular Medicine*, v. 22, n. 11, p. 946-957, 2016.

MCMULLEN, A. R. et al. When good bugs go bad: epidemiology and antimicrobial resistance profiles of pathogen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 11, p. 1-10, 2017a.

MCMULLEN, A. R. et al. When good bugs go bad: epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant, opportunistic pathogen. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 11, nov. 2017b.

MEINEL, D. M. et al. Next generation sequencing analysis of nine *Corynebacterium ulcerans* isolates reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria toxin-encoding pathogenicity island. *Genome Medicine*, v. 6, n. 11, p. 1-13, 2014.

MELTON-CELSA, A. R. Shiga Toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 4, p. 1-21, 2014.

MEŠTROVIĆ, T. et al. A 'pathogenic needle' in a 'commensal haystack': genetic virulence signatures of *Corynebacterium glucuronolyticum* that may drive its infectious propensity for the male urogenital system. *Medical Hypotheses*, v. 126, n. March, p. 38-41, 2019.

MINKIN, R.; SHAPIRO, J. M. *Corynebacterium afermentans* lung abscess and empyema in a patient with human Immunodeficiency Virus Infection. *Southern Medical Journal*, v. 97, n. 4, p. 395-397, 2004.

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

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

- MOTHERSHED, E. A. et al. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 12, p. 4713-4719, dez. 2002.
- MUNGELLUZZI, C.; CAPRILLI, F. *Corynebacterium mycetoides*, (Castellani) Ortali and Capocaccia, 1956. Etiologic agent of tropical ulcer. *Archivio italiano di scienze mediche tropicali e di parassitologia*, v. 46, n. 7, p. 301-304, 1965.
- NICOLLE, L. E. Complicated urinary tract infection in adults. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology* = *Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, v. 16, n. 6, p. 349-360, nov. 2005.
- NOVO-VELEIRO, I. et al. Paucisymptomatic infectious prostatitis as a cause of fever without an apparent origin. A series of 19 patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 32, n. 2, p. 263-268, 2013.
- NUDEL, K. et al. Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen of immunocompromised patients. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 24, n. 9, p. 1016.e7-1016.e13, set. 2018.
- ODABASI, Z.; MERT, A. Candida urinary tract infections in adults. *World Journal of Urology*, v. 38, n. 11, p. 2699-2707, 2020.
- OLENDER, A.; LETOWSKA, I. Wound infections due to opportunistic *Corynebacterium* species. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, v. 62, n. 2, p. 135-140, 2010.
- OLIVEIRA, A. et al. Insight of genus *Corynebacterium*: ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Frontiers in Microbiology*. [S.l.: s.n.].
- ÖLMEZ, S. et al. Comparison of conventional methods, automated systems, and DNA sequence analysis methods in the identification of *Corynebacterium afermentans* and *Corynebacterium mucifaciens* bacteria isolated from blood and catheter culture samples. *Microbial drug resistance* (Larchmont, N.Y.), v. 27, n. 7, p. 919-923, jul. 2021.
- OTEO, J. et al. Significant bacteremias by *Corynebacterium amycolatum*: an emergent pathogen. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, v. 19, n. 3, p. 103-106, mar. 2001.
- OTSUKA, Y. et al. *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005.
- OTT, L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS microbiology*, v. 4, n. 1, p. 85-103, 2018.
- OTT, L. et al. Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 413-421, 2012.
- OTT, L. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiology*, v. 10, 2010.

PACHECO, L. G. C. et al. Draft genome sequences of two species of “Difficult-to-Identify” human-pathogenic *Corynebacteria*: implications for better identification tests. *Journal of Genomics*, v. 3, p. 82-84, 2015.

PACHECO, L. G. C. et al. A role for Sigma Factor  $\sigma(E)$  in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to Nitric Oxide/Peroxide Stress. *Frontiers in microbiology*, v. 3, p. 126, 2012.

PADMANABHAN, R. et al. Genome sequence and description of *Corynebacterium ihumii* sp. nov. *Standards in genomic sciences*, v. 9, n. 3, p. 1128-1143, jun. 2014.

PALLEN, M. J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology*, v. 44, n. 12, p. 1025-1026, dez. 1991.

PALLET, A.; HAND, K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 65, Suppl 3, p. iii25-33, nov. 2010.

PALMER, M. et al. All ANIs are not created equal: implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2937-2948, 1 abr. 2020.

PARTE, A. C. et al. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 70, n. 11, p. 5607-5612, nov. 2020.

PAZ-ZARZA, V. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. *Revista chilena de infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, v. 36, n. 2, p. 180-189, abr. 2019.

PEIXOTO, R. S. et al. Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of osteomyelitis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 1311-1321, nov. 2016.

PICHON, M. et al. A rare case of *Corynebacterium riegelii* urosepsis: role of the MALDI-TOF mass spectrometry in the identification of emerging pathogens. *Medecine et Maladies Infectieuses*, v. 49, n. 6, p. 474-477, 2019.

PITCHER, D. et al. Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, v. 42, n. 1, p. 178-181, jan. 1992.

PORTEVIN, D. et al. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 1, p. 314-319, jan. 2004.

PROCOP, G. W. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Seventh ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.

RAMASAMY, D. et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 384-391, 2014.

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

RAMOS, J. N. et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 9, p. e180051, 2018.

RIEGEL, P. et al. Taxonomic study of *Corynebacterium* group ANF-1 strains: proposal of *Corynebacterium afermentans* sp. nov. containing the subspecies *C. afermentans* subsp. *afermentans* subsp. nov. and *C. afermentans* subsp. *lipophilum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 43, n. 2, p. 287-292, 1993.

RIZVI, M. et al. Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical site infections in a tertiary care hospital of North India. *Journal of Infection and Public Health*, v. 6, n. 4, p. 283-288, ago. 2013.

ROBERT, K.; ANNA, S.; GRAŻYNA, M. *Corynebacterium* species causing urinary tract infections. *Microbiology Research Journal International*, v. 24, n. 5, p. 1-9, 2018.

ROCHA, D. J. P. et al. Whole-genome sequencing reveals misidentification of a multidrug-resistant urine clinical isolate as *Corynebacterium urealyticum*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 23, p. 16-19, 2020.

RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. Bypassing Cultivation To Identify Bacterial Species Identify Bacterial Species. *Microbe*, v. 9, n. 3, p. 111-118, 2014.

ROY, M.; AHMAD, S. Rare case of *Corynebacterium striatum* septic arthritis. *BMJ case reports*, v. 2016, 23 set. 2016.

RYCHERT, J. Benefits and limitations of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of microorganisms. *Journal of Infectiology*, v. 2, n. 4, p. 1-5, 2019.

SABBADINI, P. S. et al. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. *Microbial pathogenesis*, v. 52, n. 3, p. 165-176, mar. 2012.

SABBADINI, P. S. et al. Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 5, p. 706-711, ago. 2010.

SABINO, Y. N. V. et al. Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019.

SALEM, N. et al. *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. *Infection and Drug Resistance*, v. 8, p. 129-145, 2015.

SANCHEZ ELUCHANS, N. et al. *Corynebacterium kroppenstedtii* breast infections: report of four cases. *Revista Argentina de Microbiologia*, n. 53 2021.

SANT'ANNA, F. H. et al. Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 182-200, 2019.

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 of Microbiological Methods*, v. 142, n. September, p. 33-35, 2017.

SATO, K.; UCHIYAMA, M. *Corynebacterium jeikeium*; bacteraemia and pulmonary infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. *BMJ Case Reports*, v. 2012, p. bcr1120115097, 20 mar. 2012.

SCHEUTZ, F. et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 2951-2963, 2012.

SCHOEN, C. et al. Life-threatening infection caused by daptomycin-resistant *Corynebacterium jeikeium* in a neutropenic patient. *Journal of clinical microbiology*, v. 47, n. 7, p. 2328-2331, jul. 2009.

SENGUPTA, M. et al. *Corynebacterium amycolatum*: an unexpected pathogen in the ear. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 12, p. 10-12, 2015.

SENTAUSA, E.; FOURNIER, P. E. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, n. 9, p. 790-795, 2013.

SHANMUGAM, L. et al. A rare case report of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* bloodstream infection in an uncontrolled diabetic with peripheral vascular disease. *Cureus*, v. 13, n. 5, 2021.

SHARIFF, M.; ADITI; BERI, K. *Corynebacterium striatum*: an emerging respiratory pathogen. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 12, n. 7, p. 581-586, 2018.

SHARMA, N. C. et al. Diphtheria. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 5, n. 1, 2019.

SHIN, J. Y. et al. Postoperative abdominal infection caused by *Corynebacterium minutissimum*. *Infection & chemotherapy*, v. 46, n. 4, p. 261-263, dez. 2014.

SHU, S. Y. et al. A new neural pathway from the ventral *striatum* to the nucleus basalis of meynert with functional implication to learning and memory. *Molecular neurobiology*, v. 56, n. 10, p. 7222-33, out. 2019.

SHUKLA, S. K. et al. *Corynebacterium nigricans* sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 41, p. 4353-8, 2003.

SIMÕES E SILVA, A. C.; OLIVEIRA, E. A.; MAK, R. H. Urinary tract infection in pediatrics: an overview. *Jornal de pediatria*, v. 96 Suppl 1, p. 65-79, 2020.

- SIMPSON-LOUREDO, L. et al. *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 2, p. 343-352, fev. 2014.
- SOKOL-LESZCZYNSKA, B. et al. *Corynebacterium coyleae* as potential urinary tract pathogen. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 38, n. 7, p. 1339-42, 2019.
- SORIANO, F. et al. In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, n. 2, p. 353-356, 2009.
- SORIANO, F.; TAUCH, A. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium urealyticum*: urinary tract stones and genomics as the rosetta stone. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, n. 7, p. 632-643, 2008.
- SOUZA, C. et al. Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 112, n. 9, p. 1331-1340, set. 2019.
- STACKEBRANDT, E; GOEBEL, B. M. Taxonomic Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.
- STACKEBRANDT, E.; JONAS, E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, v. 33, p. 152-155, 2006.
- STAPLETON, A. E. The vaginal microbiota and urinary tract infection. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 6, dez. 2016.
- STEFANŃSKA, I. et al. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Polish journal of veterinary sciences*, v. 13, n. 1, p. 143-149, 2010.
- SUPERTI, S. V. et al. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 51, n. 2, p. 115-116, 2009.
- SZEMRAJ, M.; KWASZEWSKA, A.; SZEWCZYK, E. M. New gene responsible for resistance of clinical corynebacteria to macrolide, lincosamide and Streptogramin B. *Polish journal of microbiology*, v. 67, n. 2, p. 237-240, jun. 2018.
- TAGUCHI, M. et al. Pancreatic abscess caused by *Corynebacterium coyleae* mimicking malignant neoplasm. *Pancreas*, v. 33, n. 4, p. 425-429, nov. 2006.
- TANG, L. Taxonomy of Bacteria and Archaea. *Nature methods*, v. 17, n. 6, p. 562, jun. 2020.
- TEJEDOR-JUNCO, M. T. et al. Isolation of nitrate-reductase positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* from dromedary camels. *Tropical animal health and production*, v. 40, n. 3, p. 165-167, abr. 2008.

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

THOMPSON, C. C. et al. Microbial genomic taxonomy. *BMC genomics*. [S.l: s.n.], dez. 2013.

TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. Pt 1, p. 249-266, jan. 2010.

TIWARI, T. S. P. et al. Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 3, p. 395-401, 2008.

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

TORIBIO, J. A.; MARRODÁN, T.; FERNÁNDEZ-NATAL, I. Orbital implant infection by *Corynebacterium amycolatum*. *Orbit* (London), v. 36, n. 5, p. 344-346, 2017.

TORRES, L. F. C. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 272-279, 2013.

TROST, E. et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 12, p. 3199-3215, 2012.

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

TROST, E. et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, 2010a.

TROST, E. et al. Complete genome sequence and lifestyle of black-pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1) isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2010b.

VARGHESE, N. J. et al. Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 14, p. 6761-6771, 2015.

WAGNER, K. S. et al. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 2, p. 217-225, fev. 2012.

WANG, J. et al. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China. *Journal of infection in developing countries*, v. 10, n. 12, p. 1299-1305, dez. 2016.

- WANG, X. et al. Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of China: an emerging national nosocomial epidemic. *The Journal of hospital infection*, v. 110, p. 67-75, abr. 2021.
- WAUTERS, G. et al. Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 5, p. 1430-1432, 1998.
- WAYNE, L. G. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*, v. 268, n. 4, p. 433-434, jun. 1988.
- WEERASEKERA, D. et al. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (United Kingdom)*, v. 165, n. 8, p. 876-890, 2019.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 11, p. 5088 LP 5090, 1 nov. 1977.
- YANAGAWA, R; HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. *Infection and immunity*, v. 13, n. 4, p. 1293-1295, abr. 1976.
- YASSIN, A. F.; STEINER, U.; LUDWIG, W. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 1001-1005, 2002.
- YOON, S. et al. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in gyrA gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, v. 31, n. 1, p. 47-48, 2011.
- ZAKIKHANY, K.; NEAL, S.; EFSTRATIOU, A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic tox gene-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar mitis in the United Kingdom, 2003-2012. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 19, n. 22, jun. 2014.
- ZASADA, A. A.; MOSIEJ, E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Letters in applied microbiology*, v. 66, n. 6, p. 472-483, jun. 2018.
- ZASADA, A. A.; FORMIŃSKA, K.; RZECZKOWSKA, M. Occurrence of pili genes in *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, v. 64, n. 1, p. 19-27, 2012.

## APÊNDICE A – Registro de submissão do Artigo 1

05/08/2021

Gmail - Submission confirmation for [JSEM-D-21-00507 in [International Journal] of Systematic and Evolutionary Microbiology - [EM] ...



Lincoln Sant'Anna &lt;lincolnsantanna2013@gmail.com&gt;

## Submission confirmation for [JSEM-D-21-00507 in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology - [EMID:0130b8f8aba56977]

1 mensagem

IJSEM &lt;em@editorialmanager.com&gt;

5 de agosto de 2021 11:19

Responder a: IJSEM &lt;ijsem@microbiologysociety.org&gt;

Para: Lincoln Sant'Anna &lt;lincolnsantanna2013@gmail.com&gt;

CC: "Louisy Sanches" [louisysanchesuerj@gmail.com](mailto:louisysanchesuerj@gmail.com), "Max Roberto Araújo" [max\\_barau@hotmail.com](mailto:max_barau@hotmail.com), "Danilo Rocha" [djobimpassos@gmail.com](mailto:djobimpassos@gmail.com), "Juliana Ramos" [jnr.uerj@gmail.com](mailto:jnr.uerj@gmail.com), "Paulo Victor Baio" [pvpbaio@gmail.com](mailto:pvpbaio@gmail.com), "Pedro Peloso" [pedro.peloso@richet.com.br](mailto:pedro.peloso@richet.com.br), "Cassiana Leite" [cassiana.leite@richet.com.br](mailto:cassiana.leite@richet.com.br), "Renata Peixoto" [renatamicrouerj@gmail.com](mailto:renatamicrouerj@gmail.com), "Marisa Almuzara" [marisaalmuzara@gmail.com](mailto:marisaalmuzara@gmail.com), "Carlos Vay" [carlos.vay@smdei.com](mailto:carlos.vay@smdei.com), "Claudia Barberis" [claudiabar07@gmail.com](mailto:claudiabar07@gmail.com), "Vartul Sangal" [vartul.sangal@northumbria.ac.uk](mailto:vartul.sangal@northumbria.ac.uk), "Andreas Burkovski" [andreas.burkovski@fau.de](mailto:andreas.burkovski@fau.de), "Eric Roberto Aguiar" [ergraguiar@uesc.br](mailto:ergraguiar@uesc.br), "Luis Gustavo Pacheco" [lgcpacheco@gmail.com](mailto:lgcpacheco@gmail.com), "Ana Luiza Mattos-Guaraldi" [aguaraldi@gmail.com](mailto:aguaraldi@gmail.com), "Verônica Vieira" [veronicavianavieira@hotmail.com](mailto:veronicavianavieira@hotmail.com)

Manuscript number: IJSEM-D-21-00507

Title: *Corynebacterium guaraldiae* sp. nov., a new species of *Corynebacterium* from human infections

Authors: Lincoln Sant'Anna; Louisy Sanches; Max Roberto Araújo; Danilo Rocha; Juliana Ramos; Paulo Victor Baio; Pedro Peloso; Cassiana Leite; Renata Peixoto; Marisa Almuzara; Carlos Vay; Claudia Barberis; Vartul Sangal; Andreas Burkovski; Eric Roberto Aguiar; Ana Luiza Mattos-Guaraldi; Luis Gustavo Pacheco; Verônica Vieira

Dear Mr. Sant'Anna,

Your submission entitled '*Corynebacterium guaraldiae* sp. nov., a new species of *Corynebacterium* from human infections' has been received by *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <https://www.editorialmanager.com/ijsem/>.

Your manuscript reference number is IJSEM-D-21-00507. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.

Due to the continued spread of SARS-CoV-2, many of our Editors are facing increased pressures and disruption from the closure of universities and movement to online-teaching. As such, the peer review process may take slightly longer than usual. We appreciate your patience and understanding during this time.

Thank you for submitting your work to *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, a Microbiology Society journal.

Kind regards,

Editorial Office

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*Microbiology Society | [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org)

Browse our [Collections](#) – peer reviewed content from across the Society's publishing platform on a range of hot topics and subject areas, including [Microbe Profiles](#) and [ICTV Virus Taxonomy Profiles](#) ([www.microbiologyresearch.org/content/collections](http://www.microbiologyresearch.org/content/collections)).

*In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Remove my information/details). Please contact the publication office if you have any questions.*

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**  
***Corynebacterium guaraldiae* sp. nov., a new species of *Corynebacterium* from human infections**  
 –Manuscript Draft–

|                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Manuscript Number:</b>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Full Title:</b>                  | <i>Corynebacterium guaraldiae</i> sp. nov., a new species of <i>Corynebacterium</i> from human infections                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Article Type:</b>                | Research Article                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Section/Category:</b>            | New taxa - Actinobacteria                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Corresponding Author:</b>        | Lincoln Sant'Anna<br>Universidade do Estado do Rio de Janeiro<br>BRAZIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>First Author:</b>                | Lincoln Sant'Anna                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Order of Authors:</b>            | Lincoln Sant'Anna<br>Louisy Sanches<br>Max Roberto Araújo<br>Danilo Rocha<br>Juliana Ramos<br>Paulo Victor Baio<br>Pedro Peloso<br>Cassiana Leite<br>Renata Peixoto<br>Marisa Almuzara<br>Carlos Vay<br>Claudia Barberis<br>Vartul Sangal<br>Andreas Burkovski<br>Eric Roberto Aguiar<br>Ana Luíza Mattos-Guaraldi<br>Luis Gustavo Pacheco<br>Verônica Vieira                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Manuscript Region of Origin:</b> | BRAZIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Abstract:</b>                    | Non-diphtheria <i>Corynebacterium</i> species (NDC) belonging to the human skin and mucosa microbiota are frequently neglected as contaminants. However, reports of human infections by <i>Corynebacterium</i> spp. have increased considerably in recent years. In this study, a group of six NDC isolates of urine (n = 5) and sebaceous cyst (n = 1) from two South American countries were identified at genus level or misidentified by API® Coryne, MALDI-TOF MS, 16S rRNA and rpoB gene sequencing assays. The 16S rRNA (99.09% - 99.56%) and rpoB (96.18% - 97.14%) gene sequence similarities of the isolates were higher when compared with <i>Corynebacterium aurimucosum</i> DSM 44532 T. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) indicated that these six NDC isolates compose a distinctive phylogenetic clade. Genome-based taxonomic analysis with the whole genome sequences was able to separate these six isolates from other known <i>Corynebacterium</i> type strains. Average nucleotide identity (ANIb), average amino acid identity (AAI) and digital DNA–DNA hybridization (dDDH) values between closely related type strains and the six isolates were considerably lower than the |

|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                            | currently recommended threshold values for species circumscription. Phylogenetic and genomic taxonomy analyses indicated these microorganisms as a novel <i>Corynebacterium</i> species, for which we formally propose the name <i>Corynebacterium guaraldiae</i> sp. nov. with 2218 T (= CBAS 757 T ) as type strain. |
| Author Comments:                                                                                                           | Dear Editor,<br><br>The deposit of the type strain of this manuscript is in progress, yet without formal acceptance. We are awaiting the appropriate responses from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.<br><br>Sincerely                                                                        |
| Opposed Reviewers:                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Suggested Reviewers:                                                                                                       | Cristiane Thompson<br>Federal University of the State of Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro<br>thompsoncristiane@gmail.com<br><br>Kathryn Bernard<br>Public Health Agency of Canada<br>kathy.bernard@phac-aspc.gc.ca                                                                     |
| Additional Information:                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Question                                                                                                                   | Response                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Does this article report on work with humans or animals?                                                                   | No                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Does this article include details (names, initials, hospital numbers), images, or videos relating to an individual person? | No                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## APÊNDICE B – Registro de submissão do Artigo 3

15/11/2021 15:18

Gmail - Submission Confirmation



Lincoln Sant'Anna &lt;lincolnsantanna.microuerj@gmail.com&gt;

### Submission Confirmation

**Microbes and Infection** <em@editorialmanager.com>  
 Reply-To: Microbes and Infection <microbes@pasteur.fr>  
 To: Lincoln Sant'Anna <lincolnsantanna.microuerj@gmail.com>

Tue, Nov 9, 2021 at 10:46 AM

Dear Mr. Lincoln Sant'Anna,

We have received your article "Virulence potential of the first *Corynebacterium mycetoides* strain isolated from human urine: a rare species of *Corynebacterium*" for consideration for publication in Microbes and Infection.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://www.editorialmanager.com/micinf/>
2. Enter these login details:  
 Your username is: [lincolnsantanna.microuerj@gmail.com](mailto:lincolnsantanna.microuerj@gmail.com)  
 If you need to retrieve password details, please go to:  
[http://ees.elsevier.com/micinf/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/micinf/automail_query.asp)
3. Click [Author Login]  
 This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Manager  
 Microbes and Infection

\*\*\*\*\*

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:  
[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a\\_id/160](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/160)

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/micinf/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

## Microbes and Infection

### Virulence potential of the first *Corynebacterium mycetoides* strain isolated from human urine: a rare species of *Corynebacterium*

--Manuscript Draft--

|                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Manuscript Number:</b>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Article Type:</b>                | Original article                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Keywords:</b>                    | <i>Corynebacterium mycetoides</i> ; multidrug resistance; urinary tract infection; bacterial infections                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Corresponding Author:</b>        | Lincoln Sant'Anna<br>Universidade do Estado do Rio de Janeiro<br>Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>First Author:</b>                | Lincoln de Oliveira Sant'Anna                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Order of Authors:</b>            | Lincoln de Oliveira Sant'Anna<br>Elisabete Alves Cappelli<br>Max Roberto Batista Araújo<br>Juliana Nunes Ramos<br>Liliane Simpson-Lourêdo<br>Andrezza do Espírito Santo Cucinelli<br>Paulo Victor Pereira Baio<br>Verônica Viana Vieira<br>Louisy Sanches dos Santos<br>Ana Luíza Mattos-Guaraldi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Manuscript Region of Origin:</b> | BRAZIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Abstract:</b>                    | For many years, the potential pathogenic of non-diphtheriae corynebacteria were underestimated. Nowadays, a growing number of <i>Corynebacterium</i> species are recognized as opportunistic agents of human infections, mainly in hospital settings. In addition, multidrug-resistant <i>Corynebacterium</i> isolates from clinical specimens, have been reported and the role of <i>Corynebacterium</i> spp. in urinary tract infections (UTIs) has been highlighted. Several studies have reported <i>Corynebacterium</i> species as the agent of UTIs especially in patients with risk factors. Thus, the present work aimed to report the first isolation of <i>Corynebacterium mycetoides</i> from human urine and an initial study on its virulence properties. The isolate, initially characterized by phenotypical tests as a multidrug-resistant <i>Corynebacterium</i> sp., was recovered from the urine of a female transplant patient. Mass spectrometry and system 16S rRNA and rpo B genes sequencing identified the isolate as <i>C. mycetoides</i> . The isolate was found able to adhere to and survive into epithelial cells (Vero cells), and its pathogenic potential was confirmed when tested against <i>Caenorhabditis elegans</i> nematode. The results obtained suggest that <i>C. mycetoides</i> is a potential pathogen for the urinary tract in humans and for a better understanding of the multifactorial mechanisms of virulence, studies about this species should be continued. |
| <b>Suggested Reviewers:</b>         | Aleksandra Zasada<br>azasada@pzh.gov.pl<br>Sylvain Brisse<br>sylvain.brisse@pasteur.fr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

## Images in Infectious Diseases

### *Aureobasidium melanogenum* isolation from the cerebrospinal fluid of a patient with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome: A novel report

Lincoln de Oliveira Sant'Anna<sup>(1)</sup>, Louisy Sanches dos Santos<sup>(1)</sup>  
and Max Roberto Batista Araújo<sup>(2)</sup>

[1]. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas,  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[2]. Instituto Hermes Pardini, Núcleo Técnico Operacional, Setor de Microbiologia, Vespasiano, MG, Brasil.

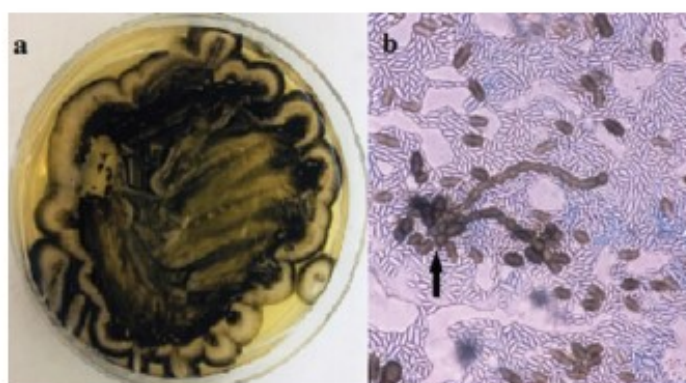


FIGURE 1: (a): Macromorphology of *A. melanogenum* in Sabouraud Dextrose agar incubated for 7 days at 25 °C. (b): Image showing dark brown conidia of *A. melanogenum* (black arrow) on a wet mount microscopy slide (40X objective lens).

A 22-year-old Brazilian man with untreated ulcerative colitis and human immunodeficiency virus (HIV) infection was admitted to the intensive care unit (ICU) for holocranial headache, fever, nausea, malaise, and diarrhea. Antiretroviral therapy (ART) was discontinued eight months earlier. Medical history included prior hospitalization due to pneumomediastinum secondary to perforated esophageal moniliasis. Laboratory tests showed leukocytosis, elevated C-reactive protein levels, high HIV viral load (133.627 copies/mL), low CD4<sup>+</sup>T-cell count (14 cells/mm<sup>3</sup>), and abnormal

levels of cerebrospinal fluid (CSF) proteins and glucose. Treatment with ceftriaxone, metronidazole, and mebendazole was initiated. Further CSF analysis was negative for *Cryptococcus* spp., but fungal culture showed the growth of black, rough colonies (Figure 1a) with conidia as observed by optical microscopy (Figure 1b). The fungus was identified as *Aureobasidium melanogenum* using gene sequencing. Treatment with amphotericin B lipid complex was initiated for 14 days, and he was discharged from the ICU after re-initiating ART.

*A. melanogenum* is ubiquitous in the environment. Although commonly considered a contaminant, this species has been increasingly associated with invasive infections in immunocompromised patients and seems to present a high pathogenic potential<sup>1-3</sup>.

Corresponding author: MSc. Lincoln de Oliveira Sant'Anna.

e-mail: [lincolnsantanna2013@gmail.com](mailto:lincolnsantanna2013@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0002-6933-8961>

Received 5 May 2021

Accepted 15 June 2021



## Images in Infectious Diseases

### *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a patient with HIV infection: complex diagnosis using Giemsa-stained bronchoalveolar lavage fluid

Louisy Sanches dos Santos<sup>[1]</sup>, Lincoln de Oliveira Sant'Anna<sup>[1]</sup>  
and Max Roberto Batista Araújo<sup>[2]</sup>

[1]. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas,  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[2]. Instituto Hermes Pardini, Núcleo Técnico Operacional, Setor de Microbiologia, Vespasiano, MG, Brasil.

A 54-year-old Brazilian man presented to the emergency department with cough, chest pain, high fever, and dyspnea. He had no history of sexually transmitted infections. A thoracic computed tomography scan showed ground-glass opacification areas and mediastinal lymphadenopathy. Laboratory tests revealed the following abnormalities: absolute monocyte count, 80 cells/mm<sup>3</sup>; partial pressure of oxygen, 55.3 mmHg; and C-reactive protein, 304.3 mg/L. Blood tests for cytomegalovirus, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Mycoplasma pneumoniae* and a sputum analysis for *Mycobacterium tuberculosis* were negative. Microscopic examination of Giemsa-stained bronchoalveolar lavage fluid (BALF) showed cysts of the atypical fungus *Pneumocystis jirovecii* (Figure 1), the etiological agent of pneumocystis pneumonia (PCP). Additional investigations revealed human immunodeficiency virus (HIV) infection, low CD4<sup>+</sup>T-cell count (128 cells/mm<sup>3</sup>), and increased lactate dehydrogenase levels. Antiretroviral therapy (ART) and trimethoprim/sulfamethoxazole (14 days) treatment were established. The patient was discharged 30 days post-admission.

PCP is a life-threatening infection that is often observed in immunocompromised individuals. Although the incidence has decreased among HIV-infected individuals due to the widespread use of ART and prophylaxis, PCP remains the most prevalent opportunistic infection among HIV-infected patients worldwide and persists as the main acquired immunodeficiency syndrome-defining infection<sup>1</sup>.

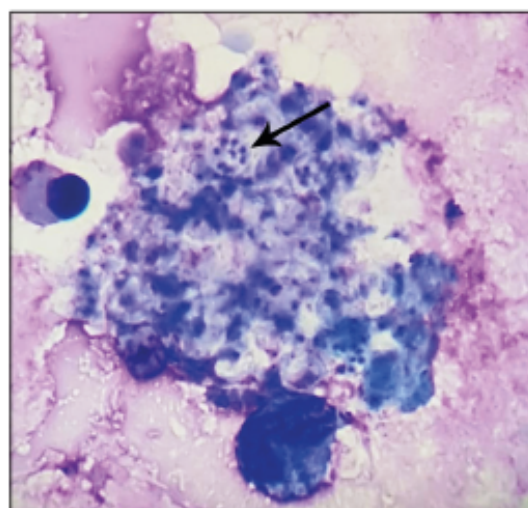


FIGURE 1: Giemsa staining (original magnification, x1000) of bronchoalveolar fluid showing cyst forms of *Pneumocystis jirovecii* (black arrow).

Due to non-specific signs and symptoms, and because *P. jirovecii* cannot be cultured in artificial media, the diagnosis of PCP is challenging. Methods involving DNA detection and serological biomarkers are available, but the microscopic observation of *P. jirovecii* in BALF is still the gold standard for PCP diagnosis<sup>1,2</sup>.

#### ETHICAL APPROVAL

The study was a retrospective analysis of laboratory data. No ethical approval was applied.

Corresponding author: Dr. Louisy Sanches dos Santos.  
e-mail: [louisysanchesuerj@gmail.com](mailto:louisysanchesuerj@gmail.com)  
https://orcid.org/0000-0002-5303-6395  
Received 15 March 2021  
Accepted 24 March 2021

## Images in Infectious Diseases

### *Klebsiella granulomatis* infection in a patient with human immunodeficiency virus infection

Max Roberto Batista Araújo<sup>[1]</sup>, Lincoln Oliveira Sant'Anna<sup>[2]</sup>  
and Louisy Sanches dos Santos<sup>[2]</sup>

[1]. Instituto Hermes Pardini, Núcleo Técnico Operacional, Setor de Microbiologia, Vespasiano, MG, Brasil.

[2]. Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas,  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

A 33-year-old man presenting with ulcerated and painless anal lesions was seen by his general practitioner in Belo Horizonte City, Minas Gerais State, Brazil. Screening tests for sexually transmitted infections (STIs) and microscopic examinations of swabs of ulcer material were conducted. Serological examinations gave positive results for human immunodeficiency virus (HIV-1), herpes simplex virus (HSV-1/2), *Treponema pallidum*, and *Chlamydia trachomatis* infections. A microscopic analysis by Giemsa staining showed negative results for Tzanck or *Haemophilus ducreyi*; however, it showed Donovan bodies that are characteristic of donovanosis (Figure 1).

The global incidence of STIs exceeds millions of cases per year, mostly affecting people aged 15–49 years. In tropical and developing areas, donovanosis, also known as granuloma inguinale, is an endemic genital ulcerative disease frequently associated with sexual transmission<sup>1,2,3</sup>.

Donovanosis is caused by *Klebsiella granulomatis*, an intracellular gram-negative bacterium. Clinically, it manifests as painless, slowly progressive ulcerative lesions in the genitals or perineum without regional lymphadenopathy. The infection can extend to the pelvis or disseminate to the intra-abdominal organs, bones, and mouth. Additionally, secondary bacterial infections in the lesions and co-infections with other sexually transmitted pathogens can be observed<sup>2,3</sup>.

*K. granulomatis* is an extremely fastidious organism that is difficult to isolate in artificial culture media. Therefore, the laboratory diagnosis of donovanosis is based on the microscopic visualization

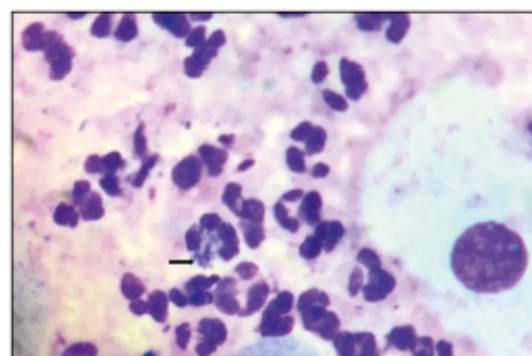


FIGURE 1: Giemsa staining (original magnification, X1000) showing Donovan bodies (black arrow).

of Donovan bodies, dark-staining encapsulated bacteria inside macrophages measuring between 0.6 and 2.5  $\mu\text{m}$  in size<sup>2,3</sup>.

Persons with both granuloma inguinale and HIV infection should receive the same regimens as those without HIV infections<sup>2</sup>.

#### AUTHORS' CONTRIBUTION

MRBA: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, and Writing-review & editing. LOS: Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Writing-review & editing. LSS: Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, and Writing-review & editing.

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

Corresponding author: Max Roberto Batista Araújo.  
e-mail: [mx\\_barau@hotmail.com](mailto:mx_barau@hotmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-3293-8496>  
Received 3 July 2020  
Accepted 18 August 2020

## Cutaneous infection by non-diphtheria-toxin producing and penicillin-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain in a patient with diabetes mellitus

Max Roberto Batista Araújo<sup>1\*</sup>, Mireille Ângela Bernardes Sousa<sup>1</sup>, Luisa Ferreira Seabra<sup>1</sup>, Letícia Aparecida Caldeira<sup>1</sup>, Carmem Dolores Faria<sup>2</sup>, Sérgio Bokermann<sup>3</sup>, Lincoln Oliveira Sant'Anna<sup>4</sup>, Louisy Sanches dos Santos<sup>4</sup> and Ana Lúcia Mattos-Guaraldi<sup>5</sup>

### Abstract

Diphtheria is a potentially fatal infection, mostly caused by diphtheria toxin (DT)-producing *Corynebacterium diphtheriae* strains. During the last decades, the isolation of DT-producing *C. diphtheriae* strains has been decreasing worldwide. However, non-DT-producing *C. diphtheriae* strains emerged as causative agents of cutaneous and invasive infections. Although endemic in countries with warm climates, cutaneous diphtheria is rarely reported in Brazil. Presently, an unusual case of skin lesion in a Brazilian elderly diabetic patient infected by a penicillin-resistant non-DT-producing *C. diphtheriae* strain was reported. Laboratory diagnosis included mass spectrometry and multiplex PCR analyses. Since cutaneous diphtheria lesions are possible sources of secondary diphtheria cases and systemic diseases and considering that penicillin is the first line of antimicrobial agent for the treatment of these infections, the detection of penicillin-resistant strains of diphtheria bacilli should be a matter of concern. Thus, cases similar to the presently reported should be appropriately investigated and treated, particularly in patients with risk factor (s) for the development of *C. diphtheriae* invasive infections, such as diabetes. Moreover, health professionals must be aware of the presence of *C. diphtheriae* in cutaneous lesions of lower limbs, a common type of morbidity in diabetic patients, especially in tropical and subtropical countries.

### INTRODUCTION

Diphtheria is a highly contagious infectious disease that often affects the respiratory tract and the skin, mostly caused by diphtheria toxin (DT)-producing *Corynebacterium diphtheriae* strains. Although included among vaccine-preventable diseases, diphtheria remains occurring worldwide, including in Brazil [1–5], leading to death even in immunized individuals [5–7].

Cutaneous diphtheria is normally associated with colonization of pre-existing skin lesions, such as surgical wounds, burns, and insect bites, mostly on the legs, feet, and hands,

by both DT-producing and non-DT-producing *C. diphtheriae* strains [3, 8–10]. *C. diphtheriae*-infected lesions act as reservoirs of this pathogen that can contaminate the environment and induce human infections in contacts more efficiently than pharyngeal infections [8, 11], contributing to the emergence of outbreaks and epidemics in vulnerable populations [11, 12].

In addition, to associated with skin infections, non-DT-producing diphtheria strains have been also reported as agents of invasive diseases, such as endocarditis, pneumonia, osteomyelitis and catheter-related infections, mainly in adult patients, with several cases of death [3, 5, 13–15].

Received 07 March 2021; Accepted 01 October 2021; Published 30 November 2021

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Operational Technical Nucleus, Microbiology, Hermes Pardini Institute, Av. das Nações, 3801 – Parque Jardim Itaipu, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup>Bacterial and Fungal Diseases Service, Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>3</sup>Center of Bacteriology, Adolfo Lutz Institute, Secretary of Health of the State of São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, The Collaborating Center for Reference and Research on Diphtheria, National Health Foundation, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil.

**\*Correspondence:** Max Roberto Batista Araújo, max\_barau@hotmail.com

**Keywords:** *Corynebacterium diphtheriae*; cutaneous diphtheria; diabetes; diphtheria toxin; MALDI-TOF MS; penicillin-resistance.

**Abbreviations:** ATCC, American Type Culture Collection; BrCAST, Brazilian Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing; DT, diphtheria toxin; HIV, human immunodeficiency virus; IGPR, irregular Gram-positive rods; LDCIC, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance; MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; mPCR, multiplex Polymerase Chain Reaction; tox, diphtheria toxin gene.

000284 © 2021 The Authors



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. The Microbiology Society waived the open access fee for this article.

**APÊNDICE D** – Apresentação oral no 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia



**APÊNDICE E – Prêmio de melhor trabalho da Área de Coleções e Culturas e Taxonomia do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia**

