



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carlos Alberto de Souza Martins

**Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de processos infecciosos
causados por *Corynebacterium* spp em pacientes de centro de referência
oncológico – Rio de Janeiro, Brasil**

Rio de Janeiro

2014

Carlos Alberto de Souza Martins

**Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de processos infecciosos causados por
Corynebacterium spp em pacientes de centro de referência oncológico – Rio de Janeiro,
Brasil**

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

Orientadores: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi
Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior.

Rio de Janeiro

2014

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

M386 Martins , Carlos Alberto de Souza.

Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de processos infecciosos causados por *Corynebacterium* spp em pacientes de centro de referência oncológico – Rio de Janeiro, Brasil / Carlos Alberto de Souza Martins. - 2014.

157 f.

Orientadores: Ana Luiza de Matos-Guaraldi, Raphael Hirata Júnior.

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

1. Câncer – Pacientes – Teses. 2. Infecções oportunistas – Teses. 3. Infecção hospitalar – Teses. 4. *Corynebacterium* – Teses. 5. Biofilme – Teses. 6. Aderências – Teses. 7. Cateteres – Teses. I. Mattos-Guaraldi, Ana Luiza de. II. Hirata Júnior, Raphael. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-006.6:616-002.1

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

Assinatura

Data

Carlos Alberto de Souza Martins

**Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de processos infecciosos causados por
Corynebacterium spp em pacientes de centro de referência oncológico – Rio de Janeiro,
Brasil**

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

Aprovada em 27 de janeiro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

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

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Rogério Lopes Rufino Alves

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Luiz Claudio Santos Thuler

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Verônica Viana Vieira

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2014

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de colegas, do mais alto nível, que aceitou colaborar nesta pesquisa, e juntos colaboraram para o sucesso deste empreendimento. Agradeço também a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para sua conclusão.

Agradeço de modo especial, aos meus orientadores, Professores Ana Luíza de Mattos-Guaraldi e Raphael Hirata Júnior, que possibilitaram, com o brilho de seus talentos, imensa capacidade de trabalho, a apresentação e o enriquecimento desta Tese.

À Lúcia Maria Dias de Faria e toda equipe do setor de microbiologia clínica do HC1-INCA, pelo zelo nos dados microbiológicos.

Ao Eduardo Duarte Velasco e demais membros da comissão de infecção hospitalar do HC1-INCA, especialmente às enfermeiras Vânia Maria da Silva e Castro Gonçalves e Venceslaine Prado Marques Oliveira pela colaboração nos dados clínico-epidemiológicos.

Ao Ricardo Vianna de Carvalho pela disponibilidade e cuidadoso trato com as informações sobre os cateteres.

Ao Luiz Cláudio Santos Thuler, do Departamento de Medicina Especializada, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNI-RIO, pela disponibilidade e objetividade das sugestões.

À Tereza C. F. Camello e demais membros da equipe do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, pelo empenho na identificação dos casos duvidosos.

A Idálio Espinheira e demais funcionários do arquivo médico do INCA, especialmente a Lucinéa Carneiro, Luiz Carlos Lassance e Claudionor Alves, pela dedicação no fornecimento de informações sob sua guarda.

À Equipe médica e demais funcionários do INCA pela compreensão e colaboração.

Aos professores e demais funcionários da equipe do PGCM e UERJ, pelo profícuo período da elaboração desse projeto.

Este trabalho teve o apoio financeiro do INCA, FAPERJ, CNPq, CAPES, SR-2/UERJ e do Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX).

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do INCA sob o número CEP 64/10 de acordo com as diretrizes éticas do governo brasileiro para

pesquisa envolvendo seres humanos (resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde /
Ministério da Saúde).

.

Observaram a verdade sobre os seres, mas acreditavam
que os seres só podem ser percebidos pelas sensações.

Aristóteles, Metafísica

Na vastidão do espaço e na imensidade do tempo, é
uma alegria para mim partilhar um planeta e uma época com Ana Maria.

apud Carl Sagan

RESUMO

MARTINS, Carlos Alberto de Souza. **Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de processos infecciosos causados por *Corynebacterium* spp em pacientes de centro de referência oncológico – Rio de Janeiro, Brasil.** 2014. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Os resultados permitiram a redação de quatro artigos. Aspectos microbiológicos e clínicos de corinebacterioses em pacientes com câncer observados durante cinco anos foram descritos no Artigo 1. No Artigo 2 foram apresentados casos de bacteremia causados por corinebactérias invasivas não toxigênicas em dois períodos com intervalo de sete anos. As infecções em pacientes com câncer por *C. diphtheriae*, causando casos clínicos atípicos foram descritas no Artigo 3, além do estudo dos principais fatores de virulência de uma cepa de *C. diphtheriae* isolada de infecção associada ao cateter de nefrostomia foi descrita no Artigo 4. Resumidamente no Artigo 1, além dos aspectos clínico-epidemiológicos foram avaliados os perfis de resistência aos antimicrobianos e o potencial de virulência dos micro-organismos. Em cinco anos, 932 amostras de corinebactérias, com perfis de resistência aos antimicrobianos testados, foram isoladas de pacientes com câncer. As espécies predominantes foram *Corynebacterium amycolatum* (44,7%), *Corynebacterium minutissimum* (18,3%) e *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (8,5%). O uso de catéteres de longa permanência e a neutropenia, foram às condições importantes para infecção por corinebactérias. As doenças de base mais comuns foram os tumores sólidos. Pacientes hospitalizados apresentaram risco seis vezes maior de morrer, quando relacionadas às taxas de mortalidade com 30 dias (RC= 5,5; IC 95%= 1,15-26,30; $p= 0,033$). As bacteremias (Artigo 2) causadas por corinebactérias foram observadas em dois períodos: 2003-2004 ($n=38$) e de 2012-2013 ($n=24$). As espécies multirresistentes *C. amycolatum* e *Corynebacterium jeikeium* foram os principais responsáveis pelos quadros de bacteremia. Havia 34 pacientes com tumores sólidos e 28 pacientes com doenças linfoproliferativas, sendo que 21 deles apresentavam neutropenia e 54 utilizavam cateter venoso central. Em 41 pacientes havia infecção relacionada ou associada aos dispositivos intravasculares. Os pacientes com bacteremia responderam ao tratamento com vancomicina após a remoção do cateter. O comportamento agressivo da neoplasia, o tempo de internação hospitalar e o uso de CVC aumentaram o risco de bacteremias por *Corynebacterium* spp. No Artigo 3, 17 casos de infecções atípicas causadas por *Corynebacterium diphtheriae* foram diagnosticadas de 1996 a 2013. A incidência de *C. diphtheriae* correspondeu a 15,8 casos/100.000 admissões, 465 vezes maior que a incidência de difteria na população brasileira. Sintomas toxêmicos foram observados em nove pacientes, embora quadros de difteria clássica e endocardite não fossem observados. O perfil eletroforético em campo pulsado (PFGE) demonstrou um perfil de distribuição endêmica, apesar de haver dois casos de pacientes com o mesmo perfil eletroforético sugerindo transmissão relacionada aos cuidados à saúde. A adesão em superfícies bióticas e abióticas e produção de biofilme em cateter de poliuretano (Artigo 4) foi demonstrada em *C. diphtheriae* não toxigênico no sítio de inserção do cateter de nefrostomia. Os dados desses artigos permitiram concluir que (i) diferentes espécies de corinebactérias multirresistentes foram capazes de causar infecções em pacientes com câncer, incluindo bacteremias; (ii) *C. diphtheriae* foi capaz de causar infecções graves em indivíduos imunocomprometidos, incluindo infecções relacionadas ao uso de dispositivos invasivos em populações de risco, tais como pacientes com câncer.

Palavras-chave: Câncer. Infecção oportunista. Corineforme. *Corynebacterium*. Biofilme.

Aderência a cateter.

ABSTRACT

MARTINS, Carlos Alberto de Souza. **Clinical-epidemiological and microbiological aspects of infectious processes caused by *Corynebacterium* spp in patients at the National Cancer Institute in Rio de Janeiro, Brazil.** 2014. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A retrospective study at the Instituto Nacional do Câncer-INCA (National Cancer Institute) in Rio de Janeiro, Brazil examined infections of *Corynebacterium* sp. in cancer patients. The results were presented in four papers. Article 1 describes microbiological and clinical aspects of corynebacteriosis in cancer patients observed over five years. Article 2 presents cases of bacteremia caused by invasive non-toxicogenic corynebacteria observed in 2003-2004 and seven years later in 2012-2013. Article 3 presents atypical clinical cases of cancer patients infected by *Corynebacterium diphtheriae*, while Article 4 is a study of the major bacterial virulence factors of an isolated strain of *C. diphtheriae* in infections associated with nephrostomy catheters. In addition to clinical and epidemiological aspects, Article 1 evaluates the antimicrobial resistance profiles and potential virulence factor of microorganisms. Over a period of five years, 932 samples of corynebacteria with antimicrobial resistance profiles were isolated from patients with cancer. The predominant species were *Corynebacterium amycolatum* (44.7%), *Corynebacterium minutissimum* (18.3%) and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (8.5%). Long-term catheter use and neutropenia were the major conditions for infection by corynebacteria. Solid tumors were the most common underlying illness. The 30-day mortality rate for patients with corynebacteria infections was six times greater in hospitalized patients than for non-hospitalized patients (OR = 5.5, 95% CI = 1.15 to 26.30, $p = 0.033$). In Article 2, bacteremia caused by corynebacteria were observed in two time frames: 2003 to 2004 ($n=38$) and 2012 to 2013 ($n=24$). The multidrug-resistant species *C. amycolatum* and *Corynebacterium jeikeium* were responsible for invasive diseases. There were 34 patients with solid tumors and 28 patients with lymphoproliferative diseases, of which 21 had neutropenia and 54 used central venous catheter. Forty-one patients experienced infection related to or associated with intravascular device. Patients with bacteremia responded to treatment with vancomycin after removal of the catheter. The aggressive behavior of the neoplasia, the hospital stay and the use of central venous catheter increased risk of bacteremias by *Corynebacterium* sp. In Article 3, 17 cases of atypical infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* were diagnosed from 1996 to 2013. The incidence of *C. diphtheriae* corresponded to 15.8 cases per 100,000 admissions which is 465 times greater than the incidence of diphtheria in the Brazilian population. Toxemic symptoms were observed in nine patients, although clinical signs of classical diphtheria and endocarditis were not observed. The Pulsed-field gel electrophoretic (PFGE) demonstrated a profile of endemic distribution, although there were two cases with identical profiles suggesting health care-related infections. Article 4 demonstrates that non-toxicogenic *C. diphtheriae* attaches to biotic and abiotic surfaces with the production of biofilm in polyurethane catheters at the nephrostomy insertion site. The data presented in these papers permit a conclusion the (i) different species of multidrug-resistant corynebacteria are capable of causing infections in cancer patients, including bacteremias; (ii) *C. diphtheriae* is capable of causing serious infections in immunocompromised individuals, including infections related to the use of disposable devices among at-risk populations such as those with cancer.

Keywords: Cancer. Opportunistic infection. Coryneform. *Corynebacterium*. Biofilm. Catheter adherence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S-rRNA	<i>16S ribosomal RNA (componente da subunidade 30S do ribossoma procariota)</i>
AA	<i>Agregação-aderencia em célula</i>
AAL	<i>Autoaggregation adherence-like (aderência a superfície celular localizada)</i>
ATB-Lock	<i>Antibiótico administrado na luz do cateter e mantido fechado</i>
BAAR	<i>Bacilo álcool-ácido resistente</i>
BAAR- modificado	<i>Bacilo álcool-ácido fraco</i>
BGPI	<i>Bacilo Gram-positivo de morfologia irregular</i>
BGPR	<i>Bacilo Gram-positivo de morfologia regular</i>
CA	<i>Catheter-associated (infecção associada ao cateter e à distância)</i>
CAMP	<i>Iniciais de Christie Atkins Munch-Petersen do teste para detecção de hemolisinas</i>
CCIH	<i>Comissão de controle de infecção hospitalar</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant (Adjuvante completo de Freund)</i>
CFU	<i>Colonies forming units (unidades formadoras de colônias)</i>
CIM	<i>Minimum inhibitory concentration (Concentração inibitória mínima)</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CP-CV	<i>cateter venoso central de curta permanência</i>
CR	<i>catheter-related (infecção atribuída ao cateter)</i>
CVC	<i>Cateter venoso central</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonuclêico</i>
DO	<i>Diário oficial da União (jornal)</i>
dtxR	<i>Diphtheria toxin repressor gene</i>
EAEC	<i>enteroaggregative Escherichia coli</i>
ECEA	<i>Escherichia coli enteroagregativa</i>
EDTA	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>

G+C	<i>Guanosina + Citosina</i>
GBS	<i>Group B Streptococcus (Streptococcus do grupo B)</i>
HC1	<i>Hospital do Câncer (unidade 1)</i>
HD	<i>Cateter de hemodiálise</i>
HEp-2	<i>Células epiteliais imortalizadas (originária de tumor de laringe)</i>
Hickmann	<i>Cateter venoso central semi-implantado de longa permanência</i>
IACS	<i>Infecção associada aos cuidados à saúde</i>
IC	<i>Índice de confiança estatístico</i>
IGS	<i>Gene intergenic spacer region</i>
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer</i>
IRAS	<i>Infecção relacionada à assistência à saúde</i>
LAL	<i>Localized adherence-like (aderência a superfície celular localizada)</i>
LH	<i>Doença de Hodgkin</i>
LLA	<i>Leucemia linfocítica aguda</i>
LMA	<i>Leucemia mielóide aguda</i>
LNH	<i>Linfoma não-Hodgkin</i>
LP-CV	<i>Cateter venoso central de longa permanência</i>
LPS	<i>Lipopolissacarideo</i>
MIC	<i>Concentração inibitória mínima</i>
mPCR	<i>Reação em cadeia da polimerase multiplex</i>
MS	<i>Ministério da Saúde</i>
NNIS System	<i>National Nosocomial Infection Surveillance System</i>
NOC	<i>Nocardia</i>
OR	<i>Odds ratio (razão de chances)</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)</i>
P-CV	<i>Acesso venoso periférico</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel em campo pulsado)</i>
PICC	<i>Cateter venoso central de longa permanência de inserção periférica</i>
Port	<i>Cateter venoso central totalmente implantado de longa permanência</i>
RC	<i>Razão de chances</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)</i>
RNA	<i>Ácido ribonuclêico</i>

rpoB	<i>gene da β subunidade da RNA polimerase</i>
SENIC	<i>Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control</i>
SGB	<i>Streptococcus do grupo B</i>
SIDA	<i>Síndrome da imunodeficiência adquirida</i>
UFC	<i>Unidade formadora de colônias</i>
UTI	<i>Unidade de terapia intensiva</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	CORINEBACTERIOSES EM PACIENTES COM CÂNCER.....	16
2	C. DIPHTHERIAE EM PACIENTES COM CÂNCER.....	19
3	INFECCÕES EM PACIENTES COM CÂNCER POR OUTROS BASTONETES GRAM-POSITIVOS.....	21
4	TAXONOMIA DAS CORINEBACTÉRIAS.....	24
5	FATORES DE RISCO INFECCIOSO EM PACIENTES COM CÂNCER..	28
6	MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO.....	30
7	FATORES DE VIRULÊNCIA MICROBIANA.....	32
8	DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES E RE-EMERGENTES.....	34
9	INFECCÕES ASSOCIADAS AOS CUIDADOS À SAÚDE (IACS)	35
10	INFECCÕES HOSPITALARES EM PACIENTES COM CÂNCER.....	36
11	INFECCÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA EM PACIENTES COM CÂNCER.....	39
12	INFECCÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM CÂNCER	41
13	INFECCÕES EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA ONCOLÓGICA.....	42
14	ANTIMICROBIANOS EM PACIENTES SOB TRATAMENTO DE CÂNCER.....	43
15	OBJETIVOS.....	45
16	RESULTADOS.....	46
16.1	Artigo científico 1: Aspectos microbiológicos e clínicos de casos de corinebacterioses em pacientes com câncer durante período de cinco anos	47
16.2	Artigo científico 2: Bacteremias causadas por espécies de corinebactérias não produtoras de toxina diftérica em pacientes atendidos no Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil.....	57
16.3	Artigo científico 3: Perfil das infecções por amostras toxigênicas e não toxigênicas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> em pacientes com câncer no Rio de Janeiro-Brasil, 1996-2013.....	81
16.4	Artigo 4: <i>Corynebacterium diphtheriae</i> como um patógeno emergente em	

	infecção relacionada a cateter de nefrostomia: análise de propriedades associadas à virulência bacteriana.....	108
17	DISCUSSÃO.....	118
	CONCLUSÕES.....	139
	REFERÊNCIAS.....	142
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética.....	158

INTRODUÇÃO

Os pacientes com câncer apresentam fatores de risco para infecção que são influenciados pelo grau da imunossupressão, pela agressividade da doença de base bem como pela toxicidade do tratamento antineoplásico instituído. Atualmente o tratamento do câncer é um procedimento complexo que se baseia em cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica ou como frequentemente ocorre, a combinação delas. O objetivo do tratamento oncológico pode ser a erradicação do câncer, o tratamento paliativo, o alívio dos sintomas ou a preservação da qualidade de vida. Normalmente, há vários fatores predisponentes à infecção associados ao paciente, à doença de base e ao tratamento oncológico, aumentando o espectro dos prováveis agentes patogênicos (Elting *et al.*, 1986; Bodey, 1995; Zembower, 1998; Donowitz *et al.*, 2001; Klastersky & Aoun, 2004; Rolston *et al.*, 2007). Devido a isto, nos últimos anos têm aumentado as infecções por bactérias Gram-positivas (Koll & Brown, 1993; Howe *et al.*, 1996; Gonzalez-Barca, *et al.*, 1996; Zinner, 1999; Gaynes, 2002). Dentre elas, as bactérias corineformes que, embora sejam patógenos oportunistas de baixa virulência, vêm sendo reconhecidas como causadoras de infecção tanto em pacientes imunossuprimidos quanto em imunocompetentes portadores de dispositivos intravasculares e endopróteses (Oteo *et al.*, 2001; Rizvi *et al.*, 2011). Nesse grupo de corineformes, alguns gêneros e espécies de corinebactérias, tais como *C. amycolatum* e *C. jeikeium* apresentam alta resistência intrínseca a antimicrobianos. Outras espécies como *C. striatum* e *C. pseudodiphtheriticum* podem adquirir resistência em internações hospitalares prolongadas e por pressão seletiva de antibióticos. A correta identificação das espécies, além da implicação terapêutica, torna-se importante na identificação de surtos e na busca de portadores humanos e reservatórios e ambientais. Algumas espécies podem ser toxinogênicas e causar doença difteria-símile. Além disso, algumas espécies têm importância epidemiológica em determinadas patologias como na neutropenia febril em pacientes em quimioterapia antineoplásica e em portadores de acesso vascular de longa permanência. Além da associação de *C. urealyticum* em pacientes com uropatia calculosa e da celulite por *C. minutissimum*.

O gênero *Corynebacterium* é constituído por ampla variedade de bacilos Gram-positivos, presentes no meio ambiente, além de integrantes da microflora humana da pele e de mucosas. Esses micro-organismos, tidos como comensais, podem se tornar verdadeiros agentes patogênicos em condições especiais. O sistema de identificação, semi-automatizado API-Coryne e eventualmente complementado por testes bioquímicos adicionais como

catalase, pirazinamidase e atividade lipolítica, motilidade, redução de nitrato, hidrólise da uréia e esculina, reação de oxidação e fermentação de açúcares e reação de CAMP, permitem boa identificação, além de triagem para os casos especiais que necessitem de complementação molecular. Há espécies filogeneticamente relacionadas difíceis de caracterizar como espécies diferentes, mas as experiências de sequenciamento demonstraram ser possível essa diferenciação. A discriminação sem ambiguidades destas espécies com base nas características fenotípicas e análise comparativa pelo gene 16S-rRNA é problemática. Métodos genéticos moleculares tais como o sequenciamento do gene da subunidade beta-codificação da RNA polimerase (*rpoB*), têm sido propostos como alternativa complementar aos métodos moleculares de amplificação pela PCR do gene 16S-rRNA para *Corynebacterium* filogeneticamente relacionadas (*C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. freneyi* e *C. hansenii*). Além disso, o produto da restrição da amplificação da região intergênica que gera o polimorfismo das regiões espaçadoras (IGS) do gene 16S-23S rRNA (RFLP) tem sido proposto para a diferenciação precisa de algumas destas espécies (Palácios *et al.*, 2010).

Espécies filogeneticamente relacionadas podem ter origens e reservatórios diferentes dificultando os estudos epidemiológicos de surtos. Além disso, esses grupos podem apresentar respostas terapêuticas diversas à antibioticoterapia, como *C. xerosis* e *C. amycolatum* multirresistentes tanto por resistência intrínseca quanto por resistência adquirida. Outro fenômeno semelhante acontece com *C. minutissimum* e *C. pseudodiphtheriticum* (Martins, 2008; Martins *et al.*, 2009).

1 CORINEBACTERIOSES EM PACIENTES COM CÂNCER

Os processos infecciosos têm um importante impacto no curso clínico e na evolução dos pacientes com câncer, sendo responsáveis pelo agravamento das condições clínicas, pelo aumento do período de internação hospitalar e pela elevação dos custos hospitalares. Essas infecções cursam com significativa mortalidade, além daquela já induzida pela doença de base. Além disso, procedimentos empregados durante a terapia antineoplásica podem induzir à disfunção da imunidade inata e adaptativa, assim como, disfunção local e sistêmica (Pittet *et al.*, 1994; Gonzalez-Barca *et al.*, 1996).

As espécies bacterianas do gênero *Corynebacterium* têm emergido como patógenos importantes em processos infecciosos de pacientes imunocomprometidos com câncer. Contudo, as metodologias usualmente empregadas na maior parte dos laboratórios de microbiologia, para o isolamento dos mesmos, costumam considerar esses micro-organismos como contaminantes ou como culturas negativas. Ao limitar o tempo de processamento do material a menos de 48 horas, restringe-se o isolamento desses corineformes, subestimando a importância clínica e a real incidência destes micro-organismos nos processos infecciosos (Wirsing & Finger, 1986; Sjöden *et al.*, 1998). Além disso, são poucos os trabalhos nos quais se procura inferir a participação desses micro-organismos nos processos infecciosos de pacientes portadores de neoplasias submetidos aos diversos procedimentos diagnósticos e terapêuticos. Algumas espécies do gênero *Corynebacterium*, tais como, *C. jeikeium* e *C. amycolatum* vêm adquirindo importância como agentes de infecções graves em pacientes com variados graus de imunossupressão (Telander *et al.*, 1988; Oteo *et al.*, 2001). Habitualmente considerados como saprófitas ou contaminantes, quando isolados em cultura, por serem encontrados no solo, poeira, materiais orgânicos ou água. Por isso, a detecção no sangue tem sido considerada como pseudobacteremia (Lee *et al.*, 2007; Rizvi *et al.*, 2013). Um fator de confusão tem sido a possível contaminação durante a punção venosa causada por constituintes de microbiota associada à pele. Por essa razão, são desconsiderados como agentes etiológicos nesses processos infecciosos com graves consequências pelo retardamento do início do tratamento. O isolamento de *Corynebacterium* spp provenientes de pacientes com neutropenia profunda e prolongada, além do cateter venoso central de longa permanência (principalmente em leucemias e linfomas), pode ser o sinal de um processo infeccioso grave, o qual não deve ser negligenciado (Velasco *et al.*, 1992b; Thuler *et al.*, 1998). Nos pacientes portadores de tumores sólidos, o risco de infecção está relacionado principalmente à obstrução pelo tumor e

(ou) com a radicalidade do procedimento cirúrgico, que pode comprometer as vias de excreção natural, gerar espaço morto e fístulas, além dos processos de cicatrização que interferem com a nutrição tecidual (Velasco *et al.*, 1992a; Velasco *et al.*, 1996; Velasco *et al.*, 1998b; Velasco *et al.*, 2000). Esses pacientes cirúrgicos tornam-se especialmente susceptíveis quando também são submetidos aos protocolos de resgate oncológico, os quais, além da terapia padrão com radioterapia, quimioterapia, cirurgia ou imunoterapia, incluem uma combinação desses tratamentos devido a uma resposta terapêutica primária insatisfatória. A incidência das infecções é variável de acordo com as características da população atendida e da alta complexidade dos tratamentos oferecidos pelo hospital. Em geral essas infecções são mais elevadas nos hospitais de atendimento terciários e universitários, os quais internam pacientes mais graves, que exigem tratamentos mais complexos e necessitam de internações mais prolongadas. O risco relativo de bacteremias nos diversos setores hospitalares varia de 6,2% para as unidades de transplante de medula óssea, de 3,5% para as unidades de terapia intensiva cirúrgica, de 1,9% para as unidades clínicas de terapia intensiva, de 1,7% para as unidades de queimados, de 1,4% para as unidades de terapia intensiva pediátrica e de 4,5% para as enfermarias de oncohematologia (Pitted, 1997).

Dentre os bacilos Gram-positivos irregulares, *Corynebacterium* spp tem sido citado frequentemente como patógeno em infecções nosocomiais associadas à sepse, endocardite infecciosa, supuração de ferida cirúrgica, contaminação de próteses e infecções pelo cateter venoso central. Têm sido descritas variações geográficas na frequência e por consequência, variações na resistência aos antimicrobianos tanto na resistência intrínseca quanto na adquirida (Osterwalder *et al.*, 1986; Rozdzinski *et al.*, 1991; van der Lelie *et al.*, 1995). Os recentes avanços na identificação das corinebactérias mostraram que o gênero apresenta considerável complexidade taxonômica e que os marcadores fenotípicos usados no passado para a sua identificação podem ser insuficientes e ambíguos (Barreau *et al.*, 1993; Brandenburg *et al.*, 1996; Oteo *et al.*, 2001; Camello *et al.*, 2003; Otsuka *et al.*, 2006; Meyer & Reboli, 2009). Para essas infecções por espécies multirresistentes, o tratamento antimicrobiano não está satisfatoriamente estabelecido (Bodey, 1995; Funke *et al.*, 1996; Camello *et al.*, 2003; Funke & Bernard, 2007). A resistência a múltiplos antimicrobianos tem sido descrita (Lagrou *et al.*, 1998; Zalas *et al.*, 2004). Mutações nos genes da girase determinam resistência a quinolonas em *C. striatum* e *C. amycolatum* (Sierra *et al.*, 2005). *C. pseudodiphtheriticum* têm sido implicados como agentes de infecções graves em pacientes adultos imunossuprimidos. Essas infecções têm alta mortalidade (23%) como descrita em países industrializados (Izurieta *et al.*, 1997). Os pacientes com infecções por *C.*

pseudodiphtheriticum tinham sido anteriormente submetidos a procedimentos invasivos com transplante de órgãos, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças neoplásicas e AIDS (Nathan *et al.*, 1982; Cimolai *et al.*, 1992; Burke *et al.*, 1997; Szmygin-Milanowska *et al.*, 2003, Teixeira *et al.*, 2007). No entanto, existem poucos relatos sobre a patogenicidade dessas infecções em indivíduos imunocompetentes (Chiner *et al.*, 1999), e sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas clínicas oriundas de países em desenvolvimento.

2 C. DIPHTHERIAE EM PACIENTES COM CÂNCER

C. diphtheriae ainda representa um considerável desafio de saúde pública mundial, particularmente devido ao aumento significativo de indivíduos adultos susceptíveis à difteria na população em geral (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001), além do surgimento de cepas não toxinogênicas como agentes causadores de infecções invasivas (Howe *et al.*, 1996; Romney *et al.*, 2006; Hirata *et al.*, 2008). Os sintomas da infecção por *C. diphtheriae* ocorrem tanto no trato respiratório superior e tonsila, quanto na pele, causando infecção superficial desses órgãos e formação de pseudomembrana branco-acinzentada. Nas formas agudas do trato respiratório, as manifestações clínicas toxi-infecciosas apresentam intenso edema local do pescoço e das cadeias linfáticas regionais. Manifestações clínicas à distância são causadas pela absorção, difusão e fixação da toxina diftérica principalmente no miocárdio, tecido nervoso, supra-renais, fígado e rins. Ocasionalmente, *C. diphtheriae* não-toxigênico pode tornar-se á invasivo e se disseminar a partir da pele e das vias respiratórias causando infecções sistêmicas, incluindo bacteremia, endocardite infecciosa e artrite séptica. O portador assintomático desse micro-organismo no trato respiratório superior e na pele ocorre comumente em áreas onde a difteria é endêmica e torna-se um importante reservatório para manutenção e propagação do micro-organismo na população (Lai & Efstratiou, 2002; Mattos-Guaraldi & Camello, 2003). Além disso, esse patógeno tem sido bem sucedido na colonização e persistência ao ambiente hospitalar (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001). *C. diphtheriae* pode ser uma causa rara de infecção relacionada ao cateter e de transmissão hospitalar (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2009).

A difteria, causada pelo *C. diphtheriae*, representou um grave problema de saúde pública mundial na primeira metade do século XX até seu controle por medidas mais efetivas de imunização, obtidas, sobretudo pelos países desenvolvidos (Dittman, 1997). Durante a epidemia que envolveu os países da antiga União Soviética, a colonização pelo micro-organismo, em lesões de pele, incluindo as úlceras decorrentes de picadas de insetos, associadas ao desleixo com as medidas básicas de higiene, foi um importante fator na transmissibilidade do clone epidêmico através da comunidade (Quick *et al.*, 2000; MacGregor, 2009). A colonização de feridas cutâneas e de tumores pode ser importante fonte na manutenção endêmica da doença. Além disso, as lesões de pele podem possibilitar surtos comunitários e hospitalares por outros micro-organismos, em associação com *C. diphtheriae*

entre pacientes portadores de neoplasias (Wilson *et al.*, 1992; Mahe, 2001; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001).

3 INFECÇÕES EM PACIENTES COM CÂNCER POR OUTROS BASTONETES GRAM-POSITIVOS

A aplicação de métodos mais avançados de biologia molecular incluindo o sequenciamento das regiões cromossômicas codificadoras do RNA ribossomal 16S (16S-rRNA) tem identificado dois principais ramos entre os bastonetes Gram-positivos. Quando associados à morfologia tintorial pelo Gram possibilitam a discriminação dos bacilos Gram-positivos de comportamento irregular (BGPI), dos bacilos Gram-positivos de comportamento regular (Coyle & Lipsky, 1990; Claridge & Spiegel, 1995; Funke, 2007; Funke & Bernard, 2007). Em uma abordagem clínica, os bacilos Gram-positivos excluindo os anaeróbios estritos, podem ser classificados em quatro grandes grupos. (1) Os bacilos Gram-positivos anaeróbios facultativos, aeróbicos e formadores de esporos (*Bacillus* spp e outros); (2) os bacilos Gram-positivos não formadores de esporos, morfologicamente regulares (*Listeria* sp); (3) os bacilos Gram-positivos não formadores de esporos, morfologicamente irregulares (corineformes); e (4) os bacilos Gram-positivos nocardioformes e actinomicetos aeróbicos. Nesta sistematização podem ser apresentadas sobreposições entre os gêneros tradicionalmente classificados como anaeróbios (anaeróbios estritos) e aqueles classificados como anaeróbios em isolamento primário e aerotolerantes em repiques (anaeróbios não estritos) (Koneman *et al.*, 1997).

Os bacilos Gram-positivos anaeróbios facultativos, aeróbicos e formadores de esporos de importância clínica são *Bacillus* spp e outros, encontrados em matéria orgânica decomposta, poeira, solo, vegetal e água. No ambiente hospitalar podem causar infecções em pacientes debilitados, imunossuprimidos e politraumatizados. Têm sido implicados como oportunistas em pacientes portadores de doenças graves e sobrevida prolongada. Além de surtos detectados em hospitais (Velasco *et al.*, 1992b; Thuler *et al.*, 1998) e em infecções alimentares toxinogênicas. Apesar da ampla distribuição desses bacilos, eles raramente estão implicados em infecção. O isolamento desses micro-organismos necessita de uma cuidadosa avaliação clínica para determinar a significância desses achados. Fatores de risco têm sido associados ao abuso de drogas intravenosas, doença falciforme, dispositivos endovenosos incluindo cateteres e imunossupressão ligada à doença maligna, a neutropenia ou à AIDS. A bacteremia verdadeira usualmente é uma complicação do uso de cateteres intravenosos implantados e o tratamento com vancomicina, a droga preconizada, frequentemente falha em deixar o cateter livre do processo infeccioso (Fekete, 2009).

Os bacilos Gram-positivos não formadores de esporos, morfológicamente regulares, apesar de raros, podem causar sérias conseqüências em pacientes com malignidades em que predominam a deficiência de imunidade celular como nos casos de linfomas e terapias medicamentosas com altas doses de glicocorticosteróides. Esses pacientes na fase de neutropenia profunda (neutrófilos <100 células/mm³) necessitam de dieta pouco contaminada ou livre de bactérias (somente alimentos cozidos). Listérias são importante causa de zoonoses especialmente em animais herbívoros. Os reservatórios naturais são solos contaminados com fezes de animais herbívoros. Alimentos de origem vegetal e animal são facilmente contaminados na presença de fontes tais como água contaminada. Embora a temperatura ideal de crescimento dessa bactéria seja entre 30°C e 37°C, elas crescem bem entre 4°C e 10°C o que explica sua frequência em alimentos refrigerados, apesar da raridade em infecções humanas. As infecções humanas situam-se nos extremos de idade, recém-natos, idosos e portadores de imunodeficiência do tipo celular (Hofer *et al.*, 2006; Lorber, 2009).

Os bacilos Gram-positivos não formadores de esporos, morfológicamente irregulares (corineformes) incluem vários gêneros de importância em infecções humanas. No laboratório clínico, o termo difteróide é usado para referir bastonetes Gram-positivos que se assemelhem ao *C. diphtheriae* na coloração de Gram. A identificação confiável dos difteróides recuperados de amostras clínicas depende da precisão taxonômica do grupo. Corineformes geralmente incluem bacilos Gram-positivos tanto aeróbicos quanto anaeróbicos não-ácido-resistentes, pleomórficos e não-ramificados. Diversos gêneros foram incluídos erroneamente no grupo dos corineformes que incluía: *Actinomyces*, *Arachnia*, *Arcanobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacterionema*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Eubacterium*, *Jensenia*, *Kurthia*, *Listeria*, *Mycobacterium* (de rápido crescimento), *Nocardia*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Rhodococcus*, e *Rothia*” (Coyle & Lipsky, 1990). Uma revisão compreendendo os gêneros que fazem parte do grupo dos micro-organismos corineformes foi publicada por Funke *et al.* (1997), evidenciando os gêneros: *Corynebacterium*, *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Propionibacterium*, *Rothia*, *Exiguobacterium*, *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Sanguibacter*, *Microbacterium*, *Aureobacterium*, "*Corynebacterium aquaticum* (atualmente *Leifsonia aquatica*)", *Arcanobacterium* e *Actinomyces*. (Funke *et al.*, 1997).

Os bacilos Gram-positivos nocardioformes e actinomicetos aeróbicos são definidos como bactérias filamentosas Gram-positivas (Stackebrandt, 1997). Esses gêneros podem ser agrupados segundo características do gênero principal. O grupo das nocardias compreende *Nocardia* sp, *Rhodococcus* sp e *Oerskovia* sp (atualmente *Cellulomonas*, (Stackebrandt,

2002)). O grupo Streptomicetos que compreende *Streptomyces* sp. O grupo Maduromicetos que compreende *Actinomadura* sp. O grupo *Termomonospora* que compreende *Nocardiosis* sp e o grupo de Esporângio loculado representado pelo *Dermatophylus* sp.

A nocardiose (NOC) (CDC, 2013) é uma importante causa de infecções em pacientes imunocomprometidos. No MD Anderson Cancer Center, da Universidade do Texas em Houston, nos Estados Unidos, de 1988 a 2001, quarenta e dois pacientes com um total de 43 episódios de NOC foram identificados (incidência de 60 casos de NOC por 100.000 internações). Vinte e sete pacientes (64%) eram portadores de neoplasias hematológicas. Treze pacientes tinham sido submetidos ao transplante de medula óssea. A neutropenia foi observada em quatro (10%) de 40 episódios e linfopenia em 20 (50%) de 40 episódios. Os pacientes receberam esteróides em 25 episódios (58%) e tinham recebido quimioterapia em 10 episódios (23%) nos últimos 30 dias. A forma pulmonar foi observada em 30 (70%) de 43 casos, enquanto a forma associada a tecidos moles foi observada sete casos (16%). NOC associada a cateteres foi observada em três casos (7%), um caso de NOC disseminada, um caso associado ao SNC e um caso de abscesso perinefrético foram observados. (Torres *et al*, 2002).

4 TAXONOMIA DAS CORINEBACTÉRIAS

A classificação filogenética da classe *Actinobacteria*, subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*, além da ordem *Bifidobacteriale* (família *Bifidobacteriaceae*), 10 subordens e 30 famílias, compreendendo um dos maiores filos do reino *Bacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997; Stackebrandt *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2007; Gao & Gupta, 2012). Na classificação taxonômica dos corineformes, com enfoque clínico, devem-se usar técnicas fenotípicas e genotípicas visando diagnóstico, tratamento e conduta. O sequenciamento das regiões cromossômicas codificadoras do RNA ribossomal 16S (16S-rRNA) dos bacilos Gram-positivos, têm duas grandes divisões: os bacilos Gram-positivos irregulares (BGPIs) e os bacilos Gram-positivos regulares (BGPR), além da complementação pela morfologia e pela reação tintorial (Coyle & Lipsky, 1990; Claridge & Spiegel, 1995; Funke, 2007; Funke & Bernard, 2007; Bernard, 2012). Os novos métodos moleculares têm delineado a descrição de novas espécies e o reagrupamento de micro-organismos em novos ou diferentes gêneros. Os micro-organismos corineformes agrupados provisoriamente pelo CDC têm sido examinados, nomeados, reclassificados e espécies novas vêm sendo descritas (Hollis & Weaver, 1981; Bernard, 2012). Dentre os organismos que foram classificados em novos gêneros e/ou espécies incluem-se: *C. afermentans* subsp *lipophilum*, *Turicella otitidis*, *C. auris* (antigo grupo ANF-1), *Campilobacter* (CDC grupo 12), *Oerskovia turbata* (CDC grupo A-3), *C. amycolatum* (CDC grupo F e alguns I-2), *C. striatum* (CDC grupo I-2), *Microbacterium* (CDC grupo A-5), *C. propinquum* (CDC grupo ANF-3), CDC grupo G-1 e G-2 englobam 3 espécies: *C. genitalium*, *C. pseudogenitalium* e *C. tuberculostearicum* e permanecem ainda provisoriamente no grupo B. Em relação ao gênero estão grupados *Arthrobacter* e *Brevibacterium* (CDC grupos B-1 e B-2), *Dermabacter* (CDC grupos 3, 5 e A), *Bifidobacterium* (CDC grupo E), *Rothia* (CDC grupos 3,4 e 5), *Exiguobacterium* (CDC grupo A-5), *Oerskovia* (CDC grupo A-1 e A-2), *Cellulomonas* (CDC grupo A-3 e A-4), *Aureobacterium* (CDC grupo E), *Leifsonia* (CDC grupo A-4 e A-5) e *Actinomyces* (CDC grupo 1) (Bernard, 2012).

Além das técnicas fenotípicas convencionais como detecção das enzimas aminopeptidases e glicosidases pré-formadas, a assimilação de carboidratos e outros compostos, a análise genética através de variadas técnicas, têm sido utilizada: o sequenciamento do RNA ribossomal 16S, a hibridização do ácido nucléico, métodos de quimiotaxonomia como detecção de ácido micólico e análise de peptideoglicanas, estudos dos

ácidos graxos celulares e caracterização do transporte eletrônico de menaquinonas (Vanechoutte *et al.*, 1995; Funke *et al.*, 1997; Lagrou *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2002; Cantarelli *et al.*, 2006).

Utilizando a morfologia tintorial pela coloração do álcool-ácido-resistente diluído (método de Ziehl-Neelsen modificado), os bacilos Gram-positivos foram classificadas em dois grupos: BAAR-positivos e BAAR-negativos. Os BAAR-positivos são *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Tsukamurella*. Os BAAR-negativos são filamentosos e não-filamentosos. Não-filamentosos com endosporos positivos: *Bacillus* e *Clostridium*; sem endosporos e catalase negativa: *Actinomyces* (exceto *A. viscosus*), *Arcanobacterium*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Gardnerella* e *Lactobacillus*. Endosporo-negativo e catalase-positiva com motilidade negativa: *A. viscosus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Dermatobacter*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Propionibacterium* e *Turicella*. Com motilidade positiva: *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Kurthia*, *Listeria* e *Microbacterium*. Os filamentosos com esporulação negativa são: *Oerskovia*, *Propionibacterium* e *Rothia dentocariosa*. Com esporulação: *Actinomadura*, *Dermatophilus*, *Faenia*, *Nocardiopsis*, *Streptomyces* e *Thermoactinomyces* (Lagrou *et al.* 1998; Bernard *et al.*, 2002).

A classificação molecular dos bacilos Gram-positivos (Koneman *et al.*, 1997) é baseada no teor de guanosina e citosina do DNA (G+C) e na subunidade 16S do RNA ribossomal. Alto teor G+C e morfologia irregular ao Gram: com aspecto ramificado (Koneman *et al.*, 1997) *Rothia*, *Lefsonia*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermatobacter* e *Propionibacterium*. Sem aspecto ramificado (Koneman *et al.*, 1997) *Turicella*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Arcanobacterium* e *Bifidobacterium*. Com Gram indiferenciado e lisina positiva: *Gardnerella*. Com Gram regular e baixo teor G+C com ramificação: *Kurthia*. Reto: *Lactobacillus* e *Erysipelotrix*. Indiferente: *Bacillus* e *Listeria*.

Segundo a classificação proposta por Funke (Funke *et al.*, 1997), baseada em características bioquímicas e fenotípicas, os bacilos Gram-positivos são divididos em corineformes e não-corineformes. Os corineformes dividem-se em corinebactérias e não-corinebactérias. As corinebactérias dividem-se em lipofílicas e não-lipofílicas. As não-lipofílicas são fermentativas e não-fermentativas. As não-corinebactérias são predominantemente Gram-positivas morfologicamente irregulares. Os não-corineformes são predominantemente Gram-positivos morfologicamente regulares. Os micro-organismos corineformes são bacilos Gram-positivos pleomórficos (irregulares), aeróbicos ou anaeróbicos

facultativos, não esporulados, retos ou encurvados ou com ramificações, não álcool-ácido resistente ou álcool-ácido resistente fraco.

A complexidade da classificação de gênero e espécie dos corineformes exigiu classificações provisórias e remanejamento na taxonomia com a introdução de novas metodologias de identificação. Essas metodologias de identificação dependem de vários fatores como: morfologia colonial (tamanho, pigmento, odor e hemólise em cultura); reações bioquímicas (reação da catalase, reação de fermentação/oxidação, motilidade, redução do nitrato, hidrólise da uréia e esculina, produção de ácido em glicose/maltose/sacarose/manitol/xilose, reação de CAMP (beta-hemolisina específica) e lipofilismo); taxonomia química, padrão CFA (adjuvante completo de Freund), presença de ácido micólico, análise de peptidoglicana, conteúdo de G+C, hidridização DNA-DNA (Funke *et al.*, 1997), além do sequenciamento de regiões amplificadas conservadas a partir dos genes *16S rRNA* (Khamis *et al.*, 2005) e *rpoB* (Khamis *et al.*, 2004).

Atualmente, as corinebactérias encontram-se na seguinte classificação taxonômica: Superregnum: *Bacteria*; Regnum: *Bacteria*; Phylum: *Actinobacteria*; Classis: *Actinobacteria*; Subclasses: *Actinobacteridae*; Ordo: *Actinomycetales*; Subordo: *Corynebacterineae*; Familia: *Corynebacteriaceae*; Genus: *Corynebacterium*; Species: *C. accolens* - *C. afermentans* - *C. ammoniagenes* - *C. amycolatum* - *C. appendicis* - *C. aquilae* - *C. argentoratense* - *C. atypicum* - *C. aurimucosum* - *C. auris* - *C. auriscanis* - *C. betae* - *C. beticola* - *C. bovis* - *C. callunae* - *C. camporealensis* - *C. capitovis* - *C. casei* - *C. caspium* - *C. ciconiae* - *C. confusum* - *C. coyleae* - *C. cystitidis* - *C. diphtheriae* - *C. durum* - *C. efficiens* - *C. equi* - *C. falsenii* - *C. fascians* - *C. felinum* - *C. flaccumfaciens* - *C. flavescens* - *C. freneyi* - *C. glaucum* - *C. glucuronolyticum* - *C. glutamicum* - *C. halotolerans* - *C. hoagii* - *C. ilicis* - *C. imitans* - *C. insidiosum* - *C. iranicum* - *C. jeikeium* - *C. kroppenstedtii* - *C. kutscheri* - *C. liliium* - *C. lipophiloflavum* - *C. liquefaciens* - *C. macginleyi* - *C. mastitidis* - *C. matruchotii* - *C. mediolaneum* - *C. michiganense* - *C. minutissimum* - *C. mooreparkense* - *C. mucifaciens* - *C. mycetoides* - *C. nebraskense* - *C. nigricans* - *C. oortii* - *C. paurometabolum* - *C. phocae* - *C. pilosum* - *C. poinsettiae* - *C. propinquum* - *C. pseudodiphtheriticum* - *C. pseudotuberculosis* - *C. pyogenes* - *C. rathayi* - *C. renale* - *C. resistens* - *C. riegelii* - *C. seminale* - *C. sepedonicum* - *C. simulans* - *C. singulare* - *C. sphenisci* - *C. spheniscorum* - *C. striatum* - *C. suicordis* - *C. sundsvallense* - *C. terpenotabidum* - *C. testudinoris* - *C. thomssenii* - *C. tritici* - *C. tuberculostearicum* - *C. ulcerans* - *C. urealyticum* - *C. variabile* - *C. vitaeruminis* - *C. xerosis* ((List of Procarotic Names with standing in Nomenclature. Disponível em:

<http://www.bacterio.net/>); família descrita por Lehmann (Lehmann & Neumann, 1896) e atualizada por Stackebrandt (Stackebrandt *et al.*, 1997).

5 FATORES DE RISCO INFECCIOSO EM PACIENTES COM CÂNCER

A infecção tem sido a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer. A maior parte desses óbitos ocorre em casos de leucemias e linfomas, porém tem havido também um crescente aumento em pacientes portadores de tumores sólidos, devido à intensificação da quimioterapia e aumento da sobrevivência. Dependendo, portanto, do tipo de neoplasia pode-se separar em dois grupos distintos quanto ao risco infeccioso. O primeiro grupo é representado principalmente pelas leucemias e linfomas em que predominam a deficiência do sistema imune local e sistêmico expresso pela imunidade celular e humoral. No segundo grupo representado pelos tumores sólidos, cuja proteção é dada pela imunidade inata não adaptativa que protege da invasão microbiana devido à integridade da pele e das mucosas (Elting *et al.*, 1997; Donowitz *et al.*, 2001).

A quimioterapia intensiva e a radioterapia causam neutropenia, além da imunossupressão humoral e celular já causada pela doença de base (Zembower, 1998; Yamaguti & Mendonça, 2006). A lesão da pele e mucosas e a obstrução de vias de excreção natural favorecem a infecção por proliferação da microbiota local. Em tumores sólidos, o risco de infecção está relacionado à obstrução tumoral e a radicalidade do procedimento cirúrgico, que podem comprometer vias de excreção natural, gerar espaço morto, fístulas e processos de cicatrização que interferem com a nutrição tecidual. Esses pacientes tornam-se especialmente susceptíveis quando submetidos a protocolos de resgate, os quais incluem, além da terapia padrão com radiação, quimioterapia, cirurgia ou imunoterapia, além de uma combinação desses tratamentos devido à resposta tumoral primária insatisfatória. Os pacientes cirúrgicos de maior risco são os portadores de carcinoma de vulva e útero, sarcoma de partes moles, melanoma maligno além de cirurgias envolvendo o aparelho gastrointestinal e as cirurgias em cabeça e pescoço (Velasco *et al.*, 1992a; Velasco *et al.*, 1996; Velasco *et al.*, 1998a; Velasco *et al.*, 1998b; Velasco *et al.*, 2000).

O estabelecimento de uma infecção clinicamente detectável ou de uma síndrome infecciosa depende da aderência, penetração e proliferação de um agente infeccioso em um hospedeiro susceptível (Alterthun, 2005). As bactérias podem ser eliminadas, tanto pela imunidade inata quanto pela imunidade humoral ou celular, além de uma combinação delas. Os mecanismos adicionais da imunidade adaptativa decorrem da opsonização das bactérias revestidas por anticorpos, lise mediada por complemento ou neutralização de toxinas por anticorpos. Os mecanismos de evasão microbiana estão relacionados à expressão de cápsulas

antifagocíticas, a exotoxinas leucotóxicas e antifagocíticas, aderência a superfícies mucosas ou por bloqueio do complemento, além da expressão de enzimas degradadoras de proteínas, ácidos nucleicos ou outros compostos. O processo infeccioso manifesta-se quando os mecanismos de evasão conseguem superar as defesas do hospedeiro, estabelecendo-se em um sítio e multiplicando-se com sucesso (Mendes & Mendes, 2005).

O isolamento de espécies do gênero *Corynebacterium* provenientes de pacientes neutropênicos pode ser representativo tanto de um processo infeccioso oportunista, quanto da colonização por micro-organismo presente no ambiente ou na microbiota da pele e das mucosas. As corinebactérias são saprófitas ou contaminantes quando isoladas em culturas pelo fato de serem encontradas no solo, poeira, material orgânico ou água. O isolamento de corinebactérias do sangue é frequentemente classificado como contaminante (pseudobacteremia) não sendo, portanto, considerado como agente etiológico do processo infeccioso. Pacientes com doenças neoplásicas avançadas, neutropenias profundas e prolongadas, desnutrição grave, procedimentos invasivos e longas internações, podem ser colonizados e/ou infectados por micro-organismos considerados como de baixo potencial de virulência, usualmente resistentes aos esquemas da antibioticoterapia empírica e com alta morbidade. A vigilância clínico-microbiológica deve ser intensificada quando tais organismos, considerados como contaminantes ambientais são isolados de pacientes em unidades de oncohematologia (Coyle & Lipsky, 1990; Clarridge & Spiegel, 1995; Riegel, 1998; Camello et al., 2003; Meyer & Reboli, 2009).

6 MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

A pele íntegra (constituente da imunidade inata) é uma importante barreira natural à penetração de micro-organismos no corpo. Raros são os micro-organismos que têm a capacidade de invadir a pele intacta. A solução de continuidade da pele proporcionada por picada de insetos, trauma acidental ou cirúrgico e procedimentos intravenosos são as portas de entrada aos micro-organismos invasores. A pele apresenta relativa secura, pH moderado (pH 5.0 a 6.0) e uma microbiota residente cujo resultado é um ambiente pouco propício à proliferação de micro-organismos patogênicos. As membranas mucosas possuem imunoglobulina G e imunoglobulina A secretória, que aglutinam micro-organismos e bloqueiam os seus receptores celulares dificultando a aderência. As secreções mucóides contêm quantidades significativas de proteínas chamadas de proteínas ligadoras de ferro, que diminuem a disponibilidade de íons ferro (um oligoelemento necessário ao crescimento microbiano) comprometendo a incorporação do ferro livre pelos micro-organismos patogênicos. Todavia, a microbiota normal da pele dispõe de mecanismos próprios para a captação desse ferro (Fernandes & Ribeiro, 2000).

Os micro-organismos ao serem aspirados pelo trato respiratório sofrem o turbilhonamento do ar inspirado e se depositam nas superfícies mucosas. Em seguida, o fluxo mucociliar os transporta e expelle através da tosse ou da deglutição. Além disso, as secreções brônquicas contêm diversas substâncias antimicrobianas incluindo a lisozima, o ácido acetilmuramínico e imunoglobulinas. Ao atingir o alvéolo, a expulsão do micro-organismo depende dos macrófagos alveolares e histiócitos e do surfactante. Os fatores predisponentes para a invasão microbiana do trato respiratório são a ventilação mecânica, traqueostomia, poluentes e alérgenos. No trato intestinal a proteção é dada pelo pH ácido do estômago e duodeno, pelas enzimas digestivas pancreáticas e biliares e pelo muco intestinal, que são potentes antimicrobianos. Além disso, a associação de peristaltismo com a descamação celular controla a população bacteriana, evitando a superpopulação e conseqüentemente a translocação. A microbiota intestinal normal devido a seu grande número diminui a disponibilidade de nutrientes dificultando a instalação de novos micro-organismos que, portanto só podem ser superados ou pela ingestão de grande número de micro-organismos ou por cepas mais virulentas. No trato geniturinário, a urina é normalmente estéril. A urina apresenta propriedades antimicrobianas para algumas espécies de bactérias, principalmente por causa do seu pH, além de conter outros mecanismos antimicrobianos que inclui a

glicoproteína de Tamm-Horsfall, produzida pelas células do túbulo contornado distal da alça de Henle, sendo excretada em grandes quantidades na urina (variando de 20 a 200 mg/litro). Esta proteína está envolvida em diversas atividades, impedindo a nucleação dos cristais de oxalato de cálcio (protegendo contra a nefrolitíase), além de modular a colonização do trato urinário, por recobrir a superfície do trato urinário (Fernandes & Ribeiro, 2000). Além disso, o fluxo urinário elimina as bactérias não fortemente aderidas. O estado hipotônico da medula renal apresenta um ambiente desfavorável para a maioria dos micro-organismos. A vagina tem sua proteção sob influência hormonal estrogênica que possibilita o crescimento de bacilos de Döderlein que metabolizam glicogênio em ácido lático criando um ambiente ácido hostil para as bactérias patogênicas. Outra barreira do corpo, como no olho, a lágrima também contém grandes quantidades de lisozima e fosfolipases além de outras substâncias antimicrobianas (Fernandes & Ribeiro, 2000).

A defesa imunitária do hospedeiro frente à agressão por um micro-organismo pode ser inata ou primária (não depende de exposição prévia) e adaptativa ou adquirida (por reconhecimento à exposição prévia ao antígeno). A primeira não gera memória imunológica, sendo proporcionadas pela pele, mucosas, secreções naturais, movimento ciliar, pelo poder bactericida dos líquidos orgânicos, lisozimas, células fagocíticas e pelo ritmo fisiológico da excreção através das vias naturais. A imunidade adaptativa pode ser estimulada por exposição à vacinação e por exposição acidental (ativa) ou transmitida passivamente por imunobiológicos (passiva). A imunidade adaptativa ativa induz a produção de citocinas, através modulação da resposta imunológica específica e recrutamento de células efetoras de resposta inflamatória e imunológica. As citocinas modulam a intensidade e a duração da resposta imunológica. A produção de anticorpos ou ativação de células fagocíticas em especial os fagócitos profissionais são exemplos de atividades mediadas pelas citocinas produzidas pelas células T, além das células endoteliais e a própria diferenciação de células T auxiliares em linfócitos Th1, Th2 e outros fenótipos funcionais de células T (Mendes & Mendes, 2005).

7 FATORES DE VIRULÊNCIA MICROBIANA

Os fatores de virulência microbianos consistem em variados recursos utilizados pelos micro-organismos para sobreviver, multiplicar e permanecer nas superfícies do hospedeiro. As bactérias utilizam de adesinas para fixação em células e tecidos do hospedeiro. Dentre as estruturas que possuem função de adesinas, as fímbrias, pili, LPS e proteínas de parede e de membrana externa podem ligar a receptores específicos na superfície de células eucarióticas. Os biofilmes multi-espécies são consórcios bacterianos agregados coraliformes, que além da proteção coletiva, suprem deficiências nutricionais e podem funcionar como substrato para aderência de espécies incapazes de aderir originalmente às estruturas eucarióticas. O passo seguinte à adesão é a invasão celular, de tecidos ou líquidos orgânicos do hospedeiro, criando nichos ecológicos que facilitam sua sobrevivência e proliferação. Infecções causadas por bactérias que formam biofilme têm sido um problema clínico adicional (Donlan, 2001; Rao *et al.*, 2008). A superfície dos dispositivos médicos intravasculares é uma excelente plataforma para o desenvolvimento dessas infecções potencialmente fatais. Estudos sobre a morfologia da aderência bacteriana no lúmen e na superfície externa dos cateteres *in vitro* e *in vivo* mostraram abundantes depósitos de substâncias amorfas (matriz extracelular dos biofilmes) ao redor de bactérias aderidas a essas superfícies (Christensen *et al.*, 1982; Marrie & Costerton, 1984). As cepas produtoras de biofilme demonstram aumento da aderência às superfícies plásticas em comparação com cepas não produtoras de biofilme. Os micro-organismos de fontes exógenas (como das mãos do pessoal médico) ou da microbiota endógena do paciente invadem o óstio da via de inserção do cateter e migram ao longo da superfície externa, colonizando eventualmente o segmento subcutâneo do cateter (Franson *et al.*, 1984). Corinebactérias não-diftéricas têm sido consideradas patógenos-infectantes ou como co-patógenos em populações de risco infeccioso tais como pacientes imunossuprimidos ou com implantes médicos invasivos (Cavendish *et al.*, 1994; Esteban *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Dobler & Braveny, 2003; Schifffl *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007; Dalal & Likhi, 2008).

A necessidade do parasito por nutrientes essenciais induz danos variados ao hospedeiro através da produção de toxinas (exo ou endotoxinas), hemolisinas, sequestro de íons ferro, indução de apoptose e necrose das células hospedeiras. Em adição, os micro-organismos protegem-se das defesas do hospedeiro através da expressão de cápsulas antifagocíticas, indução da fagocitose por células epiteliais e no bloqueio da conjugação do

lisossoma-fagossoma dos macrófagos por bactérias intracelulares, fazendo do ambiente intracelular um sítio protegido de efetores da imunidade.

Corynebacterium spp são caracterizados pela arquitetura complexa da parede celular. A membrana plasmática desta bactéria apresenta uma camada de peptidoglicana, a qual é ligada covalentemente a um polímero de arabinogalactana. Ligado a isto, há uma camada externa de ácidos micólicos funcionalmente equivalente à membrana externa das bactérias Gram-negativas. Na camada de revestimento encontram-se polissacarídeos livres, glicolípidos e proteínas. Na composição das diferentes subestruturas do envelope celular, elas influenciam a patogenicidade por provável comunicação intercelular e pela interação patógeno-hospedeiro (Burkovski, 2013).

8 DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES E RE-EMERGENTES

Com a evolução tecnológica na área de saúde, esperava-se que doenças infecciosas transmissíveis, como a dengue e a hanseníase, tivessem a sua importância reduzida como causa de morbidade e mortalidade na população. Gradativamente, agravos de natureza infecciosa seriam substituídos por doenças crônicas não transmissíveis e por causas externas, no cenário epidemiológico, completando a chamada transição epidemiológica. Apesar de o Brasil ter experimentado esta mudança no seu perfil de mortalidade, as patologias infecciosas continuaram a representar um importante fator de morbidade, sobretudo, pela emergência e re-emergência de doenças infecciosas. Com o advento da SIDA no início da década de 80 (doença causada por um vírus novo) associada ao ressurgimento da tuberculose, consolidam-se os conceitos de doença emergente e re-emergente (Brasil-MS. SVS, 2009).

Nos últimos anos têm sido observado, cada vez mais espaço na mídia acerca da ocorrência de novos problemas de saúde. Inúmeros são os exemplos. As encefalites espongiiformes transmissíveis com suas variantes bovina, ovina e humana na Europa, o aparecimento da encefalite Ocidental do Nilo em Nova Iorque e em outros estados da costa atlântica norte-americana. O retorno do Ebola, mais uma vez no Congo, e também em outros países africanos. A gripe das galinhas em Hong Kong, China, dentre muitos outros em escala internacional. No Brasil, de forma semelhante, não são poucos os exemplos. A dengue segue sua marcha, chegando agora à cidade de São Paulo, uma das poucas grandes metrópoles do país ainda poupada pela epidemia. A febre amarela "volta" em 2000 a Goiás, e então ressurgiu no Estado de Minas Gerais, muito próxima à capital, em 2001. O calazar surge no estado de São Paulo, onde nunca antes havia sido detectado. Uma epidemia de nefrite infecciosa é detectada em uma pequena cidade no centro-oeste mineiro. Aglomerados de óbitos por febres hemorrágicas desconhecidas são descritos em localizações tão diferentes quanto Santos – SP, Japerí – RJ, Natal – RN; Pancas – ES e Recife – PE. (Luna, 2002). A teoria da transição epidemiológica contempla sete fatores relacionados a doenças emergentes e re-emergentes. Desses fatores (fatores demográficos; fatores sociais e políticos; fatores econômicos; fatores ambientais; fatores relacionados ao desempenho do setor saúde; fatores relacionados às mudanças e adaptação dos micro-organismos e manipulação de micro-organismos com vistas ao desenvolvimento de armas biológicas) foram ressaltados no presente trabalho, os fatores relacionados às mudanças e adaptação dos micro-organismos (Luna, 2002).

9 INFECÇÕES ASSOCIADAS AOS CUIDADOS À SAÚDE (IACS)

O principal complicador no tratamento do câncer são as infecções e a melhor estratégia para evitá-las tem sido o encurtamento da permanência hospitalar. As intercorrências decorrentes da internação hospitalar têm sido devidas à predisposição dos pacientes à colonização pela microbiota hospitalar. A característica desta microbiota tem sido sua habilidade em sobreviver no meio ambiente hospitalar, colonizar pacientes internados e transmitir-se através das mãos e do trato respiratório de funcionários, além de causar infecção nos pacientes susceptíveis. A estratégia então é manter o paciente fora do ambiente hospitalar e quando não absolutamente possível, empreender internações de curta duração. Portanto a estratégia de tratamento é baseada no tratamento ambulatorial e no regime de hospital-dia, exceto nas complicações que implicam em risco de vida. As complicações infecciosas advindas desses pacientes não podem ser rotuladas exclusivamente como comunitárias ou como hospitalares. Em tais situações o termo infecções associadas aos cuidados à saúde (IACS) é mais apropriado do que o termo infecções relacionadas com assistência à saúde (IRAS), pois o emprego do termo "relacionado" tem implicações como agente causador e não como agente de risco. A comunidade médica europeia utiliza o termo infecção associada aos cuidados de saúde (IACS), propondo a seguinte definição: "Por infecções associadas aos cuidados de saúde entende-se as infecções contraídas quando são prestados cuidados de saúde e/ou durante uma estadia num estabelecimento de saúde (por exemplo, quando o doente recebe cuidados ambulatoriais, hospitalares ou prolongados). Quando ocorre durante a internação hospitalar, estas infecções são denominadas infecções hospitalares". Este conceito inclui claramente as infecções adquiridas pelos pacientes externos, mantendo-se a definição de infecções hospitalares àquelas adquiridas durante a internação. Assim, quando se objetiva a determinação de surtos de infecção com transmissão típica hospitalar, o termo infecção hospitalar deve ser analisado de forma mais específica (Fernandes & Ribeiro, 2000).

10 INFECÇÕES HOSPITALARES EM PACIENTES COM CÂNCER

Os fatores de risco infecciosos, relativos ao ambiente hospitalar vêm agravando a disseminação das infecções desde a criação dos hospitais na Europa medieval. O desconhecimento dos mecanismos de transmissão dos agentes infecciosos e a inexistência de medidas para seu controle na época permitiram a introdução de micro-organismos patogênicos de circulação comunitária ao ambiente hospitalar, induzindo epidemias intra e inter-hospitalares. No século XIX Holmes, Semmelweis, Nightingale e Lister desenvolveram metodologias pioneiras que originaram os conceitos atuais de epidemiologia e de controle ambiental na prevenção das infecções hospitalares (Williams *et al.*, 1960; Eickhoff, 1986; Altmeier *et al.*, 1993; La Force, 1997; Medeiros *et al.*, 2005). A introdução dos procedimentos de antissepsia e assepsia em cirurgia, assim como, o uso de medidas preventivas de transmissão de micro-organismos e o uso de agentes desinfetantes e, posteriormente, o desenvolvimento das drogas antimicrobianas, modificaram o prognóstico das cirurgias e das doenças debilitantes. Por outro lado, a aplicação intensiva e extensiva dos antibióticos vem modificando a microbiota no ambiente hospitalar através da pressão seletiva. A maior sobrevida dos pacientes imunossuprimidos, a terapêutica citotóxica das doenças neoplásicas, a terapêutica oncológica de resgate em recaídas e o tratamento neo-adjuvante na intensificação da terapêutica em neoplasias avançadas criaram populações mais susceptíveis a micro-organismos oportunistas. Os micro-organismos assim selecionados possuem resistência aos antimicrobianos comumente usados, melhor sobrevivência no ambiente hospitalar e passaram a predominar a nível mundial e por períodos prolongados. Essas características passaram a serem conhecidas como a era das pandemias hospitalares decenais (Williams *et al.*, 1960; Eickhoff, 1986; La Force, 1997; Medeiros *et al.*, 2005).

Em 1985, o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos instituiu o projeto SENIC (*Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control*) para analisar a eficácia dos programas de controle de infecção nos 10 anos anteriores e, a partir desses dados, criar as bases do *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS System) para unificar critérios, permitir comparação entre hospitais, além de estabelecer taxas de risco pela gravidade clínica, pelo tempo de internação e por procedimentos invasivos (Harley *et al.*, 1980; Harley *et al.*, 1985a; Harley *et al.*, 1985b; Hughes, 1988). O sistema NNIS criou quatro protocolos básicos: o componente global, o componente de terapia intensiva, o componente berçário de alto risco e o componente cirúrgico. A vigilância epidemiológica por componentes

é baseada na estratificação de pacientes de alto risco. O risco medido por esses componentes pode ser ajustado por tempo de permanência na unidade componente ou pela gravidade da doença de base (Emori *et al.*, 1991; Wey & Darrigo, 1996). No Brasil, a portaria ministerial 196 de 1983, criou a obrigatoriedade das comissões de controle de infecção hospitalar em todos os hospitais e unidades de saúde. Os hospitais brasileiros passaram a adotar políticas mais consistentes e sistemáticas no controle do ambiente hospitalar e na transmissão de micro-organismos multirresistentes (Brasil-MS. DO, 1983; Brasil-MS. DO, 1992; Brasil-MS-INCA, 1998a). Os laboratórios de microbiologia clínica, através de marcadores epidemiológicos, assumiram um papel relevante na vigilância, detecção e monitorização de micro-organismos multirresistentes. Em 75% das infecções em pacientes com câncer são de natureza bacteriana e destas um terço são polimicrobianas (Hughes *et al.*, 1996). Os micro-organismos mais comuns no ambiente hospitalar são: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus coagulase-negativos*. Embora *P. aeruginosa* represente 10% desses casos, as taxas de mortalidade com este micro-organismo chega a 70%.

Em muitos centros de tratamento de câncer as bacteremias causadas por micro-organismos Gram-positivos têm ultrapassado aquelas causadas por micro-organismos Gram-negativos. O uso intensivo de quimioterapia antineoplásica associada à pressão seletiva dos antibióticos, além do tratamento tanto a nível ambulatorial quanto hospitalar, têm modificado a epidemiologia dessas infecções (Koll & Brown, 1993). Essas infecções têm origem na microbiota residente ou transitória (adquirida) da pele e das mucosas. A solução de continuidade da pele e das mucosas, do trato gastrointestinal, do trato respiratório e do trato geniturinário são as principais origens dessas infecções. Os pacientes podem permanecer colonizados por um patógeno de origem hospitalar, devido aos frequentes procedimentos ambulatoriais (infecções associadas à assistência) e, durante a fase de neutropenia, apresentarem as manifestações clínicas da infecção. Outro problema, este relacionado à imunossupressão, tem sido a reativação de infecções latentes como em diversas infecções virais persistentes e na tuberculose.

A vigilância rotineira das infecções hospitalares permite a comissão de controle de infecção hospitalar (CCIH) através de taxas de infecção, determinar as tendências dessas infecções e identificar os patógenos incomuns ou o aumento acima das taxas endêmicas. A base para isso reside no uso de definições comuns e universalmente aceitas e na unificação de taxas que permitam comparações entre os hospitais e entre setores do próprio hospital. Os surtos podem ser identificados a partir da notificação de casos não usuais pela equipe médica, vigilância ativa sobre os procedimentos de risco, detecção pela microbiologia de novos

patógenos ou aumento da frequência de micro-organismos acima das taxas endêmicas, aumento da incidência de patógenos de transmissão tipicamente hospitalar, aparecimento de cepas multirresistentes ou progressivo aumento nas concentrações inibitórias aos antimicrobianos, principalmente em germes emblemáticos no ambiente hospitalar quanto na comunidade (Brasil-MS. INCA, 1998b).

A microbiologia clínica desempenha um papel fundamental no controle das infecções hospitalares, como novos patógenos oriundos de processos infecciosos nos diversos setores de atendimento ou de alterações na resistência microbiana. Alguns micro-organismos têm maior relevância epidemiológica hospitalar devido à disseminação no ambiente necessitando de estrita vigilância. Dentre eles destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina e às quinolonas; *Enterococcus* resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos; *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina; organismos Gram-positivos como *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Pediococcus* spp, *Leuconostoc* spp resistentes a vancomicina; fungos filamentosos; *Candida* sp principalmente por espécies que não 16S rRNA e bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (Pfaller & Cormican, 1997). Dentre os patógenos emergentes, os micro-organismos corineformes vêm adquirindo maior importância como agentes etiológicos de diversas infecções, incluindo as de natureza nosocomial (Osterwalder *et al.*, 1986; Rozdzinski *et al.*, 1991; van der Lelie *et al.*, 1995). Em trabalho realizado no Hospital Universitário Pedro Ernesto, no Rio de Janeiro, foi observado, que havia variações na etiologia dos processos infecciosos por topografias em relação às espécies do gênero *Corynebacterium*, quando comparadas com as espécies provenientes das mesmas topografias isoladas em unidades nosocomiais da França e da Turquia. Adicionalmente, foram observadas variações nos padrões de resistência natural e adquirida para essas bactérias (Camello *et al.*, 2003).

11 INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA EM PACIENTES COM CÂNCER

As infecções da corrente sanguínea estão entre as mais graves infecções adquiridas no ambiente hospitalar. A incidência das bacteremias varia de acordo com as características do hospital sendo mais elevada nos hospitais de atendimento terciários e universitários, que internam pacientes com maior gravidade e por tempo mais prolongado. A letalidade das infecções hospitalares na corrente sanguínea é estimada entre 20% e 40% (Halker & Wey, 1996). De acordo com os critérios do CDC dos Estados Unidos e com trabalhos publicados, as infecções da corrente sanguínea classificam-se em bacteremias primárias quando não há foco de outra origem definido, a não ser o sangue ou o cateter venoso e em bacteremias secundárias quando há disseminação de um foco a distância (Garner *et al.*, 1988; Velasco *et al.*, 1998a; Velasco *et al.*, 2000).

Os fatores de risco para infecção da corrente sanguínea envolvem: 1- tipo de população admitida ao hospital, 2- o tamanho e o tipo da instituição, 3- ano do estudo, 4- tempo de internação hospitalar e 5- o setor de internação no hospital. Os riscos relativos de bacteremia por setor hospitalar são de 6,2% em unidades de transplante de medula óssea, 3,5% em unidades de terapia intensiva cirúrgica, 1,9% em unidades de terapia intensiva clínica, 1,7% em unidades de tratamento de queimados, 1,4% em unidades de terapia intensiva pediátrica e 4,5% em enfermarias de oncohematologia (Pitted, 1997).

Os pacientes portadores de câncer necessitam de acesso venoso profundo para tratamento da doença de base, suporte nutricional e tratamento das intercorrências clínicas. Os dispositivos invasivos vêm trazendo dificuldades adicionais para localizar o foco infeccioso. Os cateteres venosos periféricos e os cateteres centrais de curta duração (poliuretano) podem ser facilmente substituídos em caso de suspeita de infecção ao contrário dos cateteres venosos centrais de longa duração que são de colocação cirúrgica. Os cateteres venosos centrais de longa duração (silicone) são caros, de difícil colocação, resistentes a contaminação e quando contaminados, o processo inflamatório é invisível à inspeção. Os critérios para diagnóstico de febre relacionada ao cateter venoso central são ausência de sinais de flebite (só visível nos cateteres periféricos), febre inexplicável exceto pela presença do cateter, febre após manipulação do cateter, ectima gangrenoso secundário e sem foco infeccioso à distância, dissociação entre o tempo de positividade da hemocultura através do cateter e a periférica, recuperação da febre após a sua retirada e uma contagem bacteriana da ponta do rolo superior a 15 unidades formadoras de colônias (UFC) (Maki *et al.*, 1977). A bacteremia

associada ao cateter profundo é definida como o isolamento do mesmo germe no cateter e simultaneamente numa veia periférica em um paciente com síndrome séptica (Windmer, 1997).

12 INFECÇÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM CÂNCER

Os micro-organismos são encontrados em 90% das incisões cirúrgicas, independentemente da técnica cirúrgica ou do ambiente hospitalar. Inicialmente o número deles é baixo, porém a proliferação é facilitada pelas condições locais favoráveis e pela redução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Martin, 1994). As infecções da ferida cirúrgica permanecem a causa líder em morbidez e mortalidade nos pacientes cirúrgicos, apesar dos avanços relativos à melhoria das técnicas operatórias, melhor compreensão da patogênese da ferida operatória e da antibioticoterapia profilática. As infecções cirúrgicas, nos Estados Unidos, prolongam a média de internação hospitalar em 7,4 dias e aumentam os custos do tratamento em cerca de 400 a 2600 dólares por episódio. As estimativas dos gastos anuais diretos são de cerca de 130 a 845 milhões de dólares. Os custos totais diretos e indiretos podem atingir 10 bilhões de dólares (Wong, 1996).

No Brasil, utilizando o componente cirúrgico da metodologia NNIS em pacientes com câncer em diferentes especialidades cirúrgicas, determinou o risco específico desses pacientes em desenvolver infecções de ferida cirúrgica. Em cirurgias limpas, envolvendo os mesmos procedimentos técnicos e com a mesma equipe cirúrgica podiam apresentar taxas diferentes de infecção dependendo da doença de base (Ferraz *et al.*, 1992; Velasco *et al.*, 1992a; Velasco *et al.*, 1996; Velasco *et al.*, 1998a).

13 INFECÇÕES EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA ONCOLÓGICA

Baseado nas diretrizes do sistema NNIS, o componente da terapia intensiva, foi analisado através da taxa de pneumonias por 1000 ventiladores/dia, bacteremias por 1000 cateteres/dia e infecção urinária por 1000 sondas urinárias/dia (Wey & Darrigo, 1996). As taxas de infecção em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) variaram de 2% a 45% dependendo do tipo de UTI, tipo de hospital e do tipo de paciente. Em um estudo envolvendo 79 hospitais nos Estados Unidos a taxa de infecção hospitalar (IH) foi de 23,7 IH por 1000 pacientes/dia (Pitted, 1997). As taxas de IH em UTI européias estudadas em 1417 unidades mostraram que 21% dos pacientes tiveram pelo menos um tipo de infecção. A taxa de pneumonias foi 47%, outras infecções do trato respiratório inferior foi 18% e de bacteremias foram 12% (Spencer, 1994).

Os avanços no tratamento do câncer têm contribuído para o aumento do número de pacientes com imunossupressão e propensos a infecções nosocomiais potencialmente fatais. Dispõem-se de poucos trabalhos disponíveis na literatura médica exclusivamente sobre pacientes oncológicos internados em UTI. Esses pacientes necessitam de recursos tecnológicos de suporte de vida, o que acarreta a necessidade de equipamentos e recursos tecnológicos avançados, nos quais os custos financeiros estão sempre em ascensão. O investimento em melhorias que podem dar maior probabilidade de sobrevida a esses pacientes têm mostrado a necessidade de indicadores epidemiológicos para medir procedimentos de risco e benefícios nestes pacientes, permitindo a adequação de recursos materiais e humanos tanto a nível mundial quanto em países com recursos humanos e financeiros limitados (Huskins *et al.*, 1996). Utilizando os procedimentos do sistema NNIS para terapia intensiva no Instituto Nacional de Câncer (INCA) durante 27 meses foram acompanhadas 370 infecções em 623 pacientes oncológicos críticos, sendo a taxa global de infecções de 91,7 IH por 1000 pacientes/dia (Velasco *et al.*, 1997).

14 ANTIMICROBIANOS EM PACIENTES SOB TRATAMENTO DE CÂNCER

A descoberta de agentes eficazes para prevenir e tratar infecções causadas por bactérias e outros micro-organismos patogênicos foi uma das descobertas mais importantes da medicina moderna. Entretanto, a emergência de resistência aos antimicrobianos por micro-organismos anteriormente sensíveis e no sentido de aumento da concentração inibitória mínima nas amostras clínicas com padrões de resistência estáveis já conhecidas, tem criado dificuldades adicionais no estabelecimento de uma terapêutica segura. Os fatores a serem considerados nessa escolha terapêutica são as características do paciente e da doença a ser tratada, topografia da infecção, patógeno identificado ou provável e características do antimicrobiano.

Os antimicrobianos podem ser usados profilaticamente em condições clínicas debilitantes como: (a) na profilaxia da pneumonia pela broncoaspiração em pacientes acamados, (b) na descontaminação seletiva gastrointestinal em casos de neutropenia profunda, (c) no implante de cateter venoso tunelizado em oncohematologia, (d) na profilaxia temporal do transplante de medula óssea, nas infecções oportunistas em portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida, e em pacientes com asplenia congênita e esplenectomizados não vacinados (Donowitz *et al.*, 2001; Lopes, 2006; Moellering & Eliopoulos, 2009).

Na neutropenia febril em pacientes com câncer tem sido indicado o uso precoce e obrigatório da antibioticoterapia empírica antes mesmo do surgimento dos sinais clínicos de infecção. A febre é o primeiro sinal clínico. Esse uso de antimicrobianos deve ser direcionado à microbiota residente ou que coloniza a pele e mucosas do paciente durante o período da neutropenia. A terapêutica antimicrobiana deve ser usada pelo tempo necessário à reversão da neutropenia ou em caso de porta de entrada definida, pelo tempo necessário a resolução do foco originário. O prolongamento desnecessário aumenta a pressão seletiva que determina a resistência e a modificação da microbiota anfibiótica, além de se evitar os efeitos indesejados da toxicidade e do custo financeiro adicional.

“O início da monoterapia com uma cefalosporina de terceira ou quarta geração, ou com um antibiótico carbapenêmico foi estabelecida na prática médica para o tratamento de pacientes neutropênicos com quadro febril. No entanto, quando a duração da neutropenia é prolongada (geralmente mais do que uma semana), as adições ou modificações, do regime inicial são necessárias com base na evolução clínico-microbiológica do paciente. A lógica para modificações, em pacientes neutropênicos de alto risco precisam ser analisadas

conjuntamente com a perspectiva da redução do risco pelo reforço da antibioticoterapia (efeito aditivo ou sinérgico) e por estímulo do sistema imunológico do hospedeiro e/ou do encurtamento do tempo para recuperação hematológica” (Pizzo, 2009).

Os princípios essenciais para efetividade e escolha dos agentes antimicrobianos são a toxicidade seletiva, a identificação microbiana, o conhecimento prévio do padrão de susceptibilidade antimicrobiana do germe infectante, o mérito relativo ao uso de drogas bactericidas em oposição a drogas bacteriostáticas e a definição do sítio de infecção. Regimes agressivos de quimioterapia antineoplásica, uso generalizado de antibióticos de largo espectro, cateteres venosos de longa duração, uso de imunomoduladores, além da gravidade da doença de base têm modificado a epidemiologia das infecções em pacientes com câncer. O isolamento de alguns patógenos classicamente considerados de baixa virulência tem levado à proposta de novos conceitos terapêuticos. Dentre os novos patógenos, os corineformes vêm emergindo como agentes importantes na etiologia das infecções nosocomiais, sobretudo em pacientes submetidos a regimes citotóxicos agressivos (Osterwalder *et al.*, 1986; Rozdzinski *et al.*, 1991; van der Lelie *et al.*, 1995; Lopes, 2005; Moellering & Eliopoulos, 2009).

Em estudos prévios, o padrão da sensibilidade aos antibióticos em *Corynebacterium* varia de espécie para espécie (Martinez-Martinez *et al.*, 1995; Funke *et al.*, 1996; Gómez-Garcés *et al.*, 2007). Ainda não há consenso sobre a padronização dos testes de sensibilidade e dos pontos de corte para medir essa sensibilidade, sendo utilizados como padrão os *Staphylococcus* spp e os valores obtidos através da determinação das concentrações inibitórias mínimas (CLSI, 2007). Os relatos crescentes das infecções oportunistas por esses microorganismos, além de falha terapêutica, é que têm demonstrado a necessidade de melhores informações e da adequação dos esquemas terapêuticos visando à tomada de decisões clínicas.

15OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral a investigação de processos infecciosos causados por *Corynebacterium* sp em pacientes de Centro de Referência Oncológico – Rio de Janeiro, Brasil durante um período de dez anos (2003 a 2013), visando a caracterização epidemiológica, as particularidades demográficas, clínicas, microbiológicas e o desfecho das corinebacterioses associadas à doença de base e aos cuidados à saúde (IACS) em oncologia.

Neste sentido foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Identificação das amostras de bastonetes Gram-positivos Irregulares (BGPIs) obtidos de processos de infecção e/ou colonização por meio de métodos fenotípicos e/ou genotípicos;
- b) Avaliação da prevalência de *Corynebacterium* sp em espécimes clínicos de diversas origens;
- c) Investigação do potencial invasor e consequente habilidade de causar quadros de bacteremias de diferentes espécies de corinebactérias não produtoras de toxina diftérica nos períodos de 2003/2004 e 2012/2013;
- d) Avaliação da prevalência de *C. diphtheriae* e outras espécies de corinebactérias potencialmente produtoras de toxina diftérica e de notificação compulsória em espécimes clínicos de diversas origens;
- e) Determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos das espécies de corinebactérias prevalentes;
- f) Investigação do potencial de virulência de amostra de *C. diphtheriae* não produtora de toxina diftérica isolada de paciente com cancer fazendo uso de dispositivo invasivo (cateter de nefrostomia);
- g) Correlação das espécies de corinebactérias e suas características microbiológicas com a topografia, relevância clínica, características da população estudada e os fatores de risco associados com a hospitalização, gravidade da doença de base e procedimentos invasivos.

16 RESULTADOS

Os estudos clínicos e experimentais realizados permitiram a organização dos resultados nos seguintes artigos científicos:

Artigo 1: Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E, Hirata R Jr, Thuler LCS, Mattos-Guaraldi AL. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five years study. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009;104:905-13. (**Qualis B1**).

Artigo 2: Martins CAS, Carvalho RV, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Santos CS, Superti SV, Nagao PE, Hirata Junior R, Mattos-Guaraldi AL. Bloodstream infections caused by non-diphtherial *Corynebacterium* species in a Cancer Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil. Em fase de submissão para Clinical Microbiology and Infection (**Qualis A1**).

Artigo 3: Martins CAS, Carvalho RV, Sant'Anna LO, Faria YV, Ramos JN, Stavracakis-Peixoto R, Superti SV, Souza MC, Santos LS, Vieira VV, Hirata Junior R, Mattos-Guaraldi AL. The spectrum of nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in cancer patients, Rio de Janeiro-Brazil, 1996-2013. Em fase de submissão para Clinical Microbiology and Infection (**Qualis A1**).

Artigo 4: Gomes, D L R; Martins, C A S; Santos, L S; Santos, C S; Sabbadini, P ; Alves, G B; Pereira, G A; Rosa, A C P; Nagao, P E; Hirata Jr, R; Mattos-Guaraldi, A L. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. J Med Microbiol. 2009; 58:1419-27. (**Qualis B1**).

16.1 Artigo 1: Aspectos microbiológicos e clínicos de casos de corinebacterioses em pacientes com cancer durante período de cinco anos

Durante um período de cinco anos, 932 amostras clínicas de pacientes com câncer, atendidos em um centro de referência no Brasil, foram identificados como *Corynebacterium*; 86% das culturas vieram de pacientes que estiveram clinicamente e microbiologicamente classificados como infectados e 77,1 % desses pacientes foram hospitalizados (71,1% de enfermarias cirúrgicas). Os tumores sólidos do adulto foram à doença maligna de base mais comum (66,7%). As análises univariada e multivariada mostraram que os pacientes hospitalizados tiveram um risco seis vezes maior ($RC = 5,5$, $IC\ 95\ \% = 1,15-26,30$ $p = 0,033$), relacionado à mortalidade em 30 dias. As espécies predominantes foram *Corynebacterium amycolatum* (44,7%), *Corynebacterium minutissimum* (18,3%) e *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (8,5%). O trato urinário superior, infecções de feridas cirúrgicas, trato respiratório inferior, tumores ulcerados e cateteres venosos de longa permanência foram às fontes mais frequentes de isolamento de cepas de *C. amycolatum*. Infecção por *Corynebacterium jeikeium* ocorreu principalmente em pacientes neutropênicos que usaram cateteres venosos, enquanto que a infecção causada por *C. amycolatum* e outras espécies surgiram principalmente em pacientes com tumores sólidos.

Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study

CAS Martins^{1,3}, LMD Faria¹, MC Souza³, TCF Camello³, E Velasco¹, R Hirata Jr³,
LCS Thuler², AL Mattos-Guaraldi^{3/+}

¹Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ³Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro 87 fundos, 3º andar, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

During a five-year period, 932 clinical isolates from cancer patients treated in a Brazilian reference centre were identified as corynebacteria; 86% of the cultures came from patients who had been clinically and microbiologically classified as infected and 77.1% of these patients had been hospitalised (71.1% from surgical wards). The adult solid tumour was the most common underlying malignant disease (66.7%). The univariate and multivariate analyses showed that hospitalised patients had a six-fold greater risk (OR = 5.5, 95% CI = 1.15-26.30 $p = 0.033$) related to 30-day mortality. The predominant species were *Corynebacterium amycolatum* (44.7%), *Corynebacterium minutissimum* (18.3%) and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (8.5%). The upper urinary tracts, surgical wounds, lower respiratory tracts, ulcerated tumours and indwelling venous catheters were the most frequent sources of *C. amycolatum* strains. *Corynebacterium jeikeium* infection occurred primarily in neutropenic patients who have used venous catheters, while infection caused by *C. amycolatum* and other species emerged mainly in patients with solid tumours.

Key words: *Corynebacterium amycolatum* - *Corynebacterium* infection - cancer

Corynebacterium species have recently been recognised as important pathogens that infect immunocompromised patients. Despite the increase in the number of reports of severe infection caused by non-diphtheria corynebacteria, these organisms are still frequently dismissed as contaminants. *Corynebacterium* spp have been cited with an increased frequency as pathogens of nosocomial infections associated with septicaemias, endocarditis, infections of surgical wounds, prostheses and infections related to the central venous catheter. Geographical variations in the frequency of isolated species and variations in the natural and acquired antimicrobial resistance have been described (Osterwalder et al. 1986, Rozdzinski et al. 1991, van der Lelie et al. 1995).

Recent advances in *Corynebacterium* identification have shown that the genus exhibits considerable taxonomic complexity and that the phenotypic markers used in the past for its identification can be ambiguous (Barreau et al. 1993, Brandenburg et al. 1996, Oteo et al. 2001, Camello et al. 2003, Meyer & Reboli 2005, Otsuka et al. 2006). When these infections are linked to multi-resistant species, they are difficult to treat (Bodey 1995, Funke et al. 1996, Camello et al. 2003, Funke & Bernard 2003). Multiple resistance to antimicrobial agents has been described among some species (Lagrou et al. 1998,

Zalas et al. 2004); for example, mutations in the gyrase genes are determinants of the resistance to quinolones in *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum* strains (Sierra et al. 2005).

In Rio de Janeiro, Brazil, recent studies conducted at a teaching hospital showed that 68% of the clinical isolates of corynebacteria species corresponded to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *Corynebacterium propinquum* and *Corynebacterium minutissimum*. The urinary tract and the venous access were the sites most commonly affected. In the blood and the respiratory tract, there was a predominance of *C. pseudodiphtheriticum* and *C. propinquum*, while *Corynebacterium xerosis* and *C. amycolatum* were the most commonly observed species in central venous catheters. *C. propinquum* and *C. minutissimum* were the most frequently observed species in surgical wounds. Data indicated the occurrence of multi-resistant phenotypes and the possibility of severe infections due to *C. pseudodiphtheriticum*, a pathogen usually overlooked in emerging countries (Camello et al. 2003, 2009).

Infection has been recognised as one of the major obstacles to the successful management of patients with malignant diseases. Few studies have described non-diphtheria corynebacteria species as emerging pathogens in patients with solid tumours, with the exception of those that highlighted the importance of *Corynebacterium jeikeium* (Rozdzinski et al. 1991, van der Lelie et al. 1995). Vancomycin has been demonstrated to be the primary treatment option for *C. jeikeium*. The choice of using glycopeptides to empirically treat patients with neutropenic fever and persistent fever has been criticised since the advent of the vancomycin-resistant *Enterococcus* and the heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (Furtado et al. 2006). The new options for therapy

Financial support: INCA, FAPERJ, CNPq, CAPES, SR-2/UERJ, PRONEX

+ Corresponding author: guaraldi@uerj.br

Received 15 May 2009

Accepted 20 August 2009

are also not completely safe for the treatment of gram positive life-threatening infections partially due to the emergence of microbial resistance (Boucher et al. 2000, Dobbs et al. 2006, Schoen et al. 2009).

The aim of this descriptive study was to assess the microbiological and clinical aspects as well as factors related to 30-day mortality in cancer patients with corynebacteriosis.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Study setting - In this descriptive study, we retrospectively reviewed clinical and microbiological data over a five-year period (from January 2000-December 2004). The patient information originated from one of the units (Cancer Hospital I with 200 beds, Cancer Hospital II with 90 beds and Cancer Hospital III with 60 beds) of the National Cancer Institute (INCA) in Rio de Janeiro, Brazil.

The analysis included bacteriological data from 88,541 cultures and 1,100 irregular gram-positive rods isolated from cancer patients. The operational units included the Laboratory of Microbiology and the Hospital Infection Control Committee (HICC) at the INCA and the Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Brazil.

During the period of the study, there were no changes in the technical team who processed the material for bacteriological cultures or in the medical team who assisted the patients.

Ethics - This paper was submitted and approved by the Ethical Research Committee at INCA (CEP 008/06) and complies with the Brazilian Government's Ethical Guidelines for research involving human beings (resolution of the National Health Council/Ministry of Health).

Diagnostic measures - The study analysed the clinical characteristics of 315 patients with *Corynebacterium* isolates who had malignant diseases or underwent bone marrow transplantation in the last two years of the study. Data assessment was performed on the basis of a medical records review of patients.

The hospitalised patients were monitored by at least one member of the HICC as a part of the antimicrobial vigilance routine through daily microbiology laboratory charts. Ambulatory patients were identified by the dressing nurses committee, catheter ambulatory (both for children and adults) and bacteriological charts.

In addition to the physicians' experiences of treating patients with cancer in INCA, the diagnosis of bacterial infection was staged according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification (CDC 1992).

The patients with positive cultures were interpreted as infected when these cultures were derived from a normally sterile site associated with a febrile illness. Alternatively, patients with positive cultures were interpreted as infected when a *Corynebacterium* spp was isolated from two or more non-sterile sites in which there was a suspicion of infection and the physician considered it clinically significant to immediately start a specific antimicrobial therapy. A positive urinary culture was considered as significant in the presence of local (dysuria,

polyuria) or systemic signs of infection; pyuria was only required in non-neutropenic patients. Tracheal secretions in intubated patients, sputum or tracheal aspirations in non-intubated patients were considered as positive if they were associated with clinical or radiological signs that indicated an infection. Protected sampling was not performed in bronchoscopy (Garner et al. 1988, Hughes et al. 1996, Berghmans et al. 2003).

Bacterial strains and identification - We retrospectively reviewed 932 strains identified as *Corynebacterium* spp that were recovered from representative clinical sites of cancer patients with signs and symptoms of bacterial infection. *Corynebacterium*-like colonies were selected for further identification when they were grown in any quantity from normally sterile body fluid or when they were isolated in significant numbers or in pure culture from other specimens obtained at clinical sites in which infection was suspected (Funke & Bernard 2003). All clinical samples yielding more than three organisms were regarded as contaminated and discarded (Thomson 2007).

The Maki's semi-quantitative method was used to distinguish infection (> 15 colonies) from contamination of catheter-tips (Maki et al. 1977). For quantitative BAL fluid cultures, a colony count > 10³ colony-forming units (CFU) mL⁻¹ of potential pathogens was considered positive. Isolation of two or three species of microorganisms was regarded as a polymicrobial infection for catheter tips and the lower respiratory tract, respectively. Microorganisms were identified from the urine cultures in cystine lactose electrolytes deficient agar (CLED; Merck, Darmstadt, Germany) and were considered to be potential pathogens when the growth was > 10⁴ CFU mL⁻¹ as the only isolate or > 10⁵ CFU mL⁻¹ as the predominant isolate; > 10³ CFU mL⁻¹, in cases of nephropathies, was also considered a potential pathogen. Blood cultures were always obtained in pairs, wherein at least one of the samples was collected through the central venous catheter, if present. Blood specimens were inoculated in Bactec Plus anaerobic/aerobic vials and processed in a Bactec 9240 continuous-monitoring system (Becton-Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, USA). Other clinical specimens were inoculated onto a Columbia agar base with the addition of 5% sheep's blood and incubated at 37°C in 3-5% CO₂ atmosphere and monitored for 72 h.

In addition to Gram staining, colonial morphology, pigmentation and haemolysis, *Corynebacterium*-like colonies were characterised using the API-Coryne System (BioMérieux, Lyon, France) (Freney et al. 1991). Microorganisms were also submitted to the following conventional biochemical assays: catalase, pyrazinamidase, lypophilic activities, motility, nitrate reduction, hydrolysis of urea and esculin, acidification of glucose, maltose, sucrose, mannitol and xylose, as well as oxidation-fermentation and CAMP reaction tests (Camello et al. 2003, Funke & Bernard 2003).

Susceptibility testing - Antimicrobial susceptibility testing was performed by the Kirby Bauer's disk diffusion method, using an inoculum of 0.5 McFarland stan-

dard (150×10^6 CFU mL⁻¹ by direct colonial suspension), adjusted for optical density at $\lambda = 550$ nm (Vitek colorimeter Durham, NC, USA). The plates were incubated at 35°C in ambient air for 24 h and reconfirmed at 48 h in a cation-adjusted Mueller-Hinton Agar with the addition of 5% sheep's blood (Funke et al. 1997). As there is not yet a defined standard by the Clinical and Laboratory Standards Institute for interpreting the results of disk diffusion tests (CLSI 2007), we used the breakpoint for penicillin suggested for *Staphylococcus*.

For the other antimicrobial agents, we used the breakpoints for other microorganisms but not *Haemophilus* spp or *Neisseria gonorrhoeae*, which had been validated by previous studies (Martinez-Martinez et al. 1995, Weiss et al. 1996, Zinkernagel et al. 1996, Funke et al. 1997).

The intermediate results were included as resistant. Microorganisms were tested against 15 antimicrobial agents, according to the clinical criteria for empirical therapy in patients with underlying malignancy and infection. The in vitro antimicrobial susceptibility test associated with the analysis of clinical relevance used the interpretation criteria suggested by the Sanford Guide (Gilbert et al. 2006): (+) usually clinically effective or > 60% susceptible, (±) clinical trials lacking or 30-60% susceptible and (0) not clinically effective or < 30% susceptible.

Statistical analysis - The variables were compared using a Pearson Chi square or Fisher exact test. For statistical significance, the value was established at $p < 0.05$. A logistic regression model was developed to identify the variables independently associated with the 30-day mortality. This model included every variable that showed a statistically significant association ($p < 0.05$) in the univariate analysis. The softwares used for the statistical analysis were Epi-Info 2000 for Windows, version 3.3.2 and SPSS, version 14.

RESULTS

During a five-year period (from January 2000-December 2004), the clinical microbiology laboratory at INCA conducted 88,541 cultures, of which 25,173 (28.4%) were positive ($n = 36,199$). Gram-positive rods represented 1,436 (4%) of the clinical isolates. The genus *Corynebacterium* corresponded with 932 (84.7%) of the total (1,100 strains) number of irregular gram-positive rods (Table I).

The *Corynebacterium* species isolated from cancer patients presenting signs and symptoms of infection are displayed in Table II. Most of the isolates (44.7%) were recognised as *C. amycolatum*, followed by *C. minutissimum* (18.3%) and *C. pseudodiphtheriticum* (8.5%). *C. jeikeium* was the sixth in frequency among the isolates (4.7%). The species *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which are usually associated with zoonoses, were absent or observed in a very low incidence in our population, respectively.

Taking into account the retrospective analysis of our study from 2000-2004, the isolation of *C. amycolatum/xerosis* increased from 10.4-72.8%. On the other hand, *C. minutissimum* decreased from 31.3-1.3%; the percentage of *Corynebacterium* spp (unidentified species) went from 11.5-0% and *C. striatum* from 12.5-0.8%. *C. xerosis* comprised 20 isolates in 2000 and six in 2001 and was absent from new isolates in the subsequent years.

During the second phase of the study (from January 2003-December 2004), 10 *Corynebacterium* species were observed in 425 clinical isolates obtained from 315 cancer patients. *C. amycolatum* was the most frequent clinical isolate, followed by *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeium* and *C. minutissimum* (Table III). When only bloodstream infections were considered, catheter-related infections were frequently observed. *C. amycolatum* was widely distributed in all topographies. The upper urinary tract, surgical wounds, lower respiratory tract, ulcerated tumours and indwelling venous catheters were the most

TABLE I
Strains of irregular gram-positive rods isolated from cancer patients between 2000-2004

Genus	2000 n(%)	2001 n(%)	2002 n(%)	2003 n(%)	2004 n(%)	Total n(%)
<i>Corynebacterium</i>	192 (80.3)	158 (83.2)	152 (78.8)	191 (88.0)	239 (91.6)	932 (84.7)
<i>Arcanobacterium</i>	16 (6.7)	4 (2.1)	8 (4.1)	8 (3.7)	5 (1.9)	41 (3.7)
<i>Brevibacterium</i>	13 (5.4)	1 (0.5)	7 (3.6)	7 (3.2)	4 (1.5)	32 (2.9)
<i>Actinomyces</i>	6 (2.5)	5 (2.6)	11 (5.7)	1 (0.5)	2 (0.8)	25 (2.3)
<i>Aureobacterium</i>	2 (0.8)	10 (5.3)	8 (4.1)	1 (0.5)	2 (0.8)	23 (2.1)
<i>Arthrobacter</i>	-	7 (3.7)	3 (1.6)	4 (1.8)	7 (2.6)	21 (1.9)
<i>Leifsonia</i>	8 (3.3)	4 (2.1)	3 (1.6)	1 (0.5)	1 (0.4)	17 (1.5)
<i>Propionibacterium</i>	1 (0.5)	1 (0.5)	-	3 (1.3)	1 (0.4)	6 (0.6)
<i>Rothia</i>	1 (0.5)	-	1 (0.5)	1 (0.5)	-	3 (0.3)
Total	239 (100)	190 (100)	193 (100)	217 (100)	261 (100)	1,100 (100)

the strains identified as gram-positive regular rods [*Lactobacillus* (213), *Bacillus* (94), *Rhodococcus* (17), *Listeria* (9), *Nocardia* (2) and unidentified irregular gram-positive rods (1)] were not included in this study.

TABLE II
Corynebacterium species isolated from cancer patients between 2000-2004

Species	2000 n (%)	2001 n (%)	2002 n (%)	2003 n (%)	2004 n (%)	Total n (%)
<i>Corynebacterium xerosis</i> / <i>Corynebacterium amycolatum</i>	20 (10.4)	40 (25.3)	65 (42.8)	118 (61.8)	174 (72.8)	417 (44.7)
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	60 (31.3)	54 (34.2)	37 (24.3)	17 (8.9)	3 (1.3)	171 (18.3)
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	9 (4.7)	10 (6.3)	7 (4.6)	16 (8.5)	37 (15.5)	79 (8.5)
<i>Corynebacterium</i> spp	22 (11.5)	23 (14.6)	5 (3.3)	2 (1.0)	-	52 (5.6)
<i>Corynebacterium striatum</i>	24 (12.5)	10 (6.3)	4 (2.6)	9 (4.7)	2 (0.8)	49 (5.3)
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3 (1.6)	7 (4.4)	8 (5.3)	17 (8.9)	9 (3.8)	44 (4.7)
<i>Corynebacterium propinquum</i>	5 (2.6)	5 (3.2)	9 (5.9)	3 (1.6)	6 (2.5)	28 (3.0)
<i>Corynebacterium afermentans</i>	10 (5.2)	2 (1.3)	1 (0.7)	2 (1.0)	4 (1.7)	19 (2.0)
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	6 (3.1)	3 (1.9)	3 (2.0)	-	2 (0.8)	14 (1.5)
<i>Corynebacterium</i> Group G	2 (1.0)	3 (1.9)	4 (2.6)	2 (1.0)	1 (0.4)	12 (1.3)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	4 (2.1)	-	4 (2.6)	2 (1.0)	1 (0.4)	11 (1.2)
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	-	-	2 (1.3)	3 (1.6)	-	5 (0.5)
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1 (0.5)	-	-	-	-	1 (0.1)
<i>Corynebacterium accolens</i>	-	-	1 (0.7)	-	-	1 (0.1)
Others ^b	26 (13.5)	1 (0.6)	2 (1.3)	-	-	29 (3.2)
Total	192 (100)	158 (100)	152 (100)	191 (100)	239 (100)	932 (100)

a: 20 strains in 2000 and six in 2001 and no isolates in the following years; b: includes species previously classified as Group I (1 isolate), Group A (2), Group B (12), Group F (7), Group F1 (3), Group GI (3) and Group G2 (1).

frequent sources of *C. amycolatum* strains. *C. pseudodiphtheriticum* strains were mainly isolated from the lower and upper respiratory tract and *C. jeikeium* from the intravenous sites and skin lesions. The antimicrobial spectra of microorganisms are exhibited in Table IV.

Clinical data of the 315 cancer patients with fever and/or other signs of infection were retrieved. The epidemiological characteristics, the topographies that were involved and the factors that predisposed cancer patients to corynebacteria infection are depicted in Table V. The findings were interpreted as infection in 86% of patients and specific treatments were initiated. *Corynebacterium* strains were observed as the only microorganism in 46% of the cultures. Bacterial colonisation was confirmed in 44 cases (14%), 35 of which originated in the respiratory tract (25 rhinosinusal, 3 lower respiratory and 7 upper respiratory), four cases were in central venous catheters (Maki method negative), two cases were in skin/tumours and one case was in a surgical wound; two cases were isolated from the digestive tract.

The main underlying malignant diseases were 66.7% adult solid tumours, followed by tumours of the central nervous system and paediatric solid tumours (10.8% and 9.2%, respectively). The patients from surgical wards (71.1%) were previously submitted to head and neck (25.1%), gynaecological (13.3%) and abdominal-pelvic (9.5%) surgeries. Surgical wound infections comprised 32.7% of these patients. The patients from clinical wards were from pediatrics (28.9%), oncology (12.1%) and haematology (7.3%). The majority of patients had been hospitalised (77.1%) and exposed to a hospital environment for a long term (median = 13 days).

The clinical-epidemiological characteristics of 315 patients with 30-day mortality involved a uni and multivariate analysis of risk factors for corynebacteria-associated infection (Table IV).

DISCUSSION

Identification of non-diphtheria bacteria at the species level is often problematic. Recent advances in identification have shown that the genus exhibits considerable taxonomic complexity and the phenotypic markers that have been used in the past for its identification can be ambiguous. Even when sent to a reference laboratory, 30-50% of coryneform bacteria isolates cannot be reliably identified at the species level. Consequently, there is a low rate of identification from clinical isolates (Schiff et al. 2004).

Variations in the occurrence of *Corynebacterium* species during the course of the study were probably due to improvements in the taxonomy and laboratory diagnosis of the genus *Corynebacterium*. The substantial increase in the number of *C. amycolatum* isolates was partially due to the disappearance of *C. xerosis* and the significant reduction of *C. striatum* and *C. minutissimum*, which reflects the progress in the diagnosis of *Corynebacterium* species and consequently, the variability in antimicrobial sensitivity patterns. The former *Corynebacterium* CDC F-2 and CDC I-2 groups have been reclassified as *C. amycolatum*.

Due to imprecise diagnosis at the species level, data from the first three years (507 strains) were not included in the analysis of the bacteriological and clinical characteristics of cancer patients with corynebacteriosis.

TABLE III
Strains of nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from varied clinical sources in cancer patients (n = 315)

Organism	Total n (%)	Respiratory tract infections		Surgical wound infections		Urinary tract infections		Intravenous sites		Skin/ tumour	Rhino sinusal	Misc
		U/L	U/L	U/L	U/L	Catheter	Blood					
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	230 (73.0)	7/48	56	38/0	19	4	9/22	3	24			
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	39 (12.4)	3/11	4	0/0	0	0	0/1	19	1			
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	13 (4.1)	1/1	2	0/0	4	1	1/3	0	0			
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	12 (3.8)	0/2	1	0/3	1	0	2/1	0	2			
<i>Corynebacterium propinquum</i>	8 (2.5)	0/3	0	1/0	1	0	0/0	2	1			
<i>Corynebacterium striatum</i>	6 (1.9)	1/3	2	0/0	0	0	0/0	0	0			
<i>Corynebacterium afermentans</i>	3 (1.0)	0/1	0	0/0	1	1	0/0	0	0			
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	2 (0.7)	0/0	0	0/0	1	1	0/0	0	0			
<i>Corynebacterium</i> Group G	1 (0.3)	0/0	0	0/0	0	0	0/0	1	0			
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	1 (0.3)	0/0	0	1/0	0	0	0/0	0	0			
Total	315 (100)	12/69	65	40/3	27	7	12/27	25	28			

L: lower; Misc: miscellaneous [genital tract: 8 (*C. amycolatum*), gastrointestinal tract: 5 (*C. amycolatum*), 4 (*C. minutissimum*); 1, nephrostomy: 3 (*C. amycolatum*), eye: 3 (*C. amycolatum*); 2 (*C. propinquum*); 1, bone: 2 (*C. amycolatum*), oropharynx: 2 (*C. amycolatum*); 1, abscess: 2 (*C. amycolatum*); sinus: 2 (*C. amycolatum*); 1, *C. pseudodiphtheriticum*]; U: upper.

Many non-diphtheria corynebacteria-caused access infections can be effectively treated by antibiotics and local care. Susceptibility testing of corynebacteria is highly recommended to establish a specific therapy (CLSI 2007). Except for the unvarying activity of vancomycin against corynebacteria, the variability in resistance to other classes of antimicrobial agents emphasises the need for the continuous surveillance of their resistance patterns. Resistance to oxacillin was observed for all corynebacteria species isolated from cancer patients at INCA. The data emphasise the relevance of susceptibility testing of *Corynebacterium* isolates during the diagnosis and treatment of infections in cancer patients.

A growing number of reports have confirmed the importance of *C. amycolatum* in the aetiology of a variety of infectious processes. In the reviewed literature, many *C. amycolatum* clinical isolates were at first identified in different laboratories as *C. xerosis* (Funke et al. 1996) and *C. minutissimum* (Zinkernagel et al. 1996). After the mid-1990s, with the advent of the taxonomical characterisation of *C. amycolatum*, this species has been described as a causal agent of infections with high morbidity and mortality rates. Multi-resistant *C. amycolatum* strains were isolated from patients with septicæmia (Berner et al. 1997, de Miguel et al. 1999, Camello et al. 2003), septic arthritis after vascular transplants (Clarke et al. 1999), cardiac electrode implantation (Vanechoutte et al. 1998), infections in vascular prostheses and open fractures (von Graevenitz et al. 1998), peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis (Chiu et al. 2005), infectious endocarditis accompanied by aorto-atrial fistula (Daniels et al. 2003), nosocomial endocarditis (Knox & Holmes 2002) and septicæmia in leukemic patients (de Miguel et al. 1999). These reports drew attention to the clinical significance of *C. amycolatum* strains in different clinical materials (Esteban et al. 1999).

The clinical characteristics of the patients with favourable outcomes and documented corynebacteriosis could not be compared with those patients who died (controls). Due to the nature of the present research, which was a retrospective study, we could not investigate the pathogenicity of the isolates in relation to 30-day mortality in cancer patients. For the same reason, it was impossible to establish prognostic factors in these patients considering their descriptive characters. Another limitation of this study was the exclusion of isolates from 2000-2002 in the complete analysis due to major changes in taxonomical classification. Nevertheless, the sampling procedures adopted in this study allowed us to detect some patterns and characteristics of the population under investigation.

The univariate and multivariate analyses showed that hospitalised patients had a six-fold greater risk (OR = 5.5, 95% CI = 1.15-26.30 p = 0.033) related to 30-day mortality. Also of statistical significance were patients bedridden for longer than 50% of the day with neoplastic disease in progress or diabetes mellitus.

The study revealed that corynebacteria are increasingly being recognised as a cause of infections in cancer patients. These organisms have been underreported, but

TABLE IV
Comparison of antimicrobial spectra of *Corynebacterium* species (315 patients/425 strains)

Species (samples)	Vancomycin	Amikacin	Tobramycin	Cefazolin	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefepime	Imipenem	Penicillin G	Ampicillin	Oxacillin	Ciprofloxacin	Ofloxacin	Erythromycin	Chloramphenicol
<i>Corynebacterium amycolatum</i> (292)	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	±	±	±	±
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> (53)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
<i>Corynebacterium jeikeium</i> (26)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium minutissimum</i> (20)	+	+	+	+	+	0	+	+	±	±	0	±	±	±	±
<i>Corynebacterium striatum</i> (11)	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	±	±	+	0
<i>Corynebacterium propinquum</i> (9)	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	±	±
<i>Corynebacterium afermentans</i> (6)	+	+	+	+	+	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±
<i>Corynebacterium</i> Group G (3)	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+
<i>Corynebacterium argentoratense</i> (3)	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	0	+	+	+	+
<i>Corynebacterium urealyticum</i> (2)	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	0	0

+: > 60%; ±: 30-60%; 0: < 30% (% sensitivity).

TABLE V
Risk factors to mortality related to *Corynebacterium* spp infection in 315 cancer patients

Predictors	Patients who survived n = 271 (%)	Patients who died n = 44 (%)	OR (95% CI)	p value
Age < 65 years	197 (72.7)	29 (65.9)	1.38 (0.66-2.85)	0.354
≥ 65 years	74 (27.3)	15 (34.1)		
Gender (female)	154 (56.8)	18 (40.9)	0.52 (0.27-1.00)	0.049
Central venous catheter used	31 (11.4)	7 (15.9)	1.46 (0.60-3.56)	0.398
Central venous catheter infection	22 (8.1)	6 (13.6)	1.78 (0.68-4.69)	0.251 ^a
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	7 (2.6)	5 (11.4)	4.83 (1.46-15.98)	0.016 ^a
Hospitalized patients	201 (74.2)	42 (95.5)	7.31 (1.72-31.00)	0.002
Infection (versus colonization)	232 (85.6)	39 (88.6)	1.31 (0.48-3.53)	0.591
Diabetes mellitus (plasma glucose > 200 mg/dL)	19 (7.0)	8 (18.2)	2.94 (1.20-7.22)	0.036 ^a
Renal insufficiency (creatinine > 2.0 mg/dL)	20 (7.4)	10 (22.7)	3.69 (1.59-8.54)	0.004 ^a
Hematopoietic stem cell transplantation	5 (1.8)	1 (2.3)	1.23 (0.14-0.84)	0.598 ^a
Co-infection	102 (37.6)	26 (59.1)	2.39 (1.25-4.58)	0.007
Undergo surgery	156 (57.6)	16 (36.4)	0.42 (0.21-0.81)	0.009
Surgical wound infection	63 (23.2)	2 (4.5)	0.15 (0.03-0.66)	0.004
COPD	14 (5.2)	2 (4.5)	0.87 (0.19-3.98)	1.000 ^a
Confined to bed more than 50% of waking hours	42 (15.5)	20 (45.5)	4.54 (2.30-8.95)	< 0.001
Solid tumors	240 (88.6)	34 (77.3)	0.43 (0.19-0.97)	0.039
Length of stay > 13 days	165 (60.9)	27 (61.4)	1.02 (0.53-1.96)	0.952
Neutropenia (< 1000 µL/cells)	14 (5.2)	4 (9.1)	1.83 (0.57-5.85)	0.294 ^a
Isolated in pure culture	125 (46.1)	20 (45.5)	0.97 (0.51-1.84)	0.934
Isolated in association	23 (8.5)	6 (13.6)	1.70 (0.65-4.45)	0.266 ^a
Isolated in co-infection not related	22 (8.1)	5 (11.4)	1.45 (0.51-4.05)	0.559 ^a
Under nutrition (weight loss > 10%)	43 (15.9)	13 (29.5)	2.22 (1.07-4.59)	0.028
Body temperature > 38°C	19 (7.0)	4 (9.1)	1.32 (0.42-4.10)	0.543 ^a
Mucositis (NCI scale > 3)	4 (1.5)	0 (0.0)	0.85 (0.82-0.89)	1.000 ^a



Predictors	Patients who survived n = 271 (%)	Patients who died n = 44 (%)	OR (95% CI)	p value
Karnofsky index < 70%	87 (32.1)	28 (63.6)	3.70 (1.90-7.19)	< 0.001
Corticotherapy (prednisone > 40 mg/day)	27 (10.0)	3 (6.8)	0.66 (0.19-2.28)	0.781 ^a
Arterial hypotension (systolic < 90 mm/hg)	18 (6.6)	10 (22.7)	4.13 (1.76-9.69)	0.002 ^a
Graft-versus-host disease	2 (0.7)	1 (2.3)	3.12 (0.27-35.24)	0.364 ^a
Isolated in persistent infection	33 (12.2)	8 (18.2)	1.60 (0.68-3.74)	0.272
Radiotherapy	94 (34.7)	12 (27.3)	0.70 (0.34-1.43)	0.334
Tracheotomy	48 (17.7)	13 (29.5)	1.94 (0.94-3.99)	0.065
Progressive disease	108 (39.9)	33 (75.0)	4.52 (2.19-9.34)	< 0.001
Chemotherapy	76 (28.0)	13 (29.5)	1.07 (0.53-2.16)	0.837
Others <i>Corynebacterium</i> growing in association	58 (22.1)	13 (30.2)	1.52 (0.74-3.11)	0.244
Ascites	5 (1.8)	0 (0.0)	0.85 (0.82-0.89)	1.000 ^a
Tumoral embolization	1 (0.4)	1 (2.3)	6.27 (0.38-102.27)	0.260 ^a
Pulmonary thrombo-embolism	11 (4.1)	2 (4.5)	1.12 (0.24-5.25)	0.700 ^a
Instrumentalization	14 (5.2)	3 (6.8)	1.34 (0.37-4.87)	0.716 ^a

a: Fisher exact test

TABLE VI
Multivariate analysis of independent risk factors for 30-day mortality

Variable	OR	95% CI	p value
Hospitalized patients	5.500	1.150 - 26.304	0.033
Confined to bed more than 50% of waking hours	3.621	1.173 - 11.179	0.025
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	3.560	0.681 - 18.625	0.133
Progressive disease	3.167	1.346 - 7.453	0.008
Diabetes mellitus (plasma glucose > 200 mg/dL)	3.106	1.015 - 9.504	0.047
Renal insufficiency (creatinine > 2.0 mg/dL)	2.710	0.951 - 7.722	0.062
Arterial hypotension (systolic < 90 mm/hg)	2.429	0.851 - 6.934	0.097
Undernutrition (weight loss > 10%)	1.842	0.710 - 4.779	0.209
Isolated in co-infection no related	1.260	0.572 - 2.773	0.566
Solid tumors	0.762	0.268 - 2.169	0.610
Gender (male)	0.656	0.295 - 1.457	0.301
Undergo surgery	0.441	0.192 - 1.012	0.053
Karnofsky < 70	0.835	0.287 - 2.425	0.740

they may account for approximately 4% of the cases of infection in patients presenting solid tumours. The data reflects a tendency towards infection or colonisation by *Corynebacterium* in cancer patients who have undergone surgical procedures and a long subsequent hospitalisation period. From the study data, we also emphasise the need for the rigorous identification of *Corynebacterium* species isolates from different sites, especially of invasive strains in patients with clinical conditions of persistent fever and no other attributable site of infection. *C. jeikeium* infection occurs primarily in neutropenic patients who have used venous catheters (Rozdzinski et al. 1991), while *C. amycolatum* infection appears mainly in patients with solid tumours.

REFERENCES

- Barreau C, Bimet F, Kiredjian M, Rouillon N, Bizet C 1993. Comparative chemotaxonomic studies of mycolic acid-free coryneform bacteria of human origin. *J Clin Microbiol* 31: 2085-2090.
- Berghmans T, Sculier JP, Klastersky J 2003. A prospective study of infections in lung cancer patients admitted to the hospital. *Chest* 124: 114-120.
- Berner R, Pelz K, Wilhelm C, Funke A, Leititis JU, Brandis M 1997. Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. *J Clin Microbiol* 35: 1011-1012.
- Bodey GP 1995. Emerging antimicrobial-resistant pathogens in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis* 8: 411-414.
- Boucher HW, Wennersten CB, Eliopoulos GM 2000. *In vitro* activi-

- ties of the glycolycycline GAR-936 against gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2225-2229.
- Brandenburg AH, van Belkum A, van Pelt C, Bruining HA, Mouton JW, Verbrugh HA 1996. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J Clin Microbiol* 34: 2089-2094.
- Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA 2003. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol* 34: 39-44.
- Camello TCF, Souza MC, Martins CAS, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL 2009. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. *Lett Appl Microbiol* 48: 458-464.
- CDC - Center for Disease Control and Prevention 1992. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep* 41: 1-19.
- Chiu YL, Wu VC, Wun KD, Hsueh PR 2005. Recurrent peritonitis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol* 63: 241-242.
- Clarke R, Qamruddin A, Taylor M, Panigrahi H 1999. Septic arthritis caused by *Corynebacterium amycolatum* following vascular graft sepsis. *J Infect* 38: 126-127.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2007. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. *Approved Standard Document M45-A*, CLSI, Wayne, p. 4-6.
- Daniels C, Schoors D, Van Camp G 2003. Native valve endocarditis with aorta-to-left atrial fistula due to *Corynebacterium amycolatum*. *Eur J Echocardiogr* 4: 68-70.
- de Miguel I, Rodriguez E, Martin AM 1999. *Corynebacterium amycolatum*: sepsis in hematologic patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 17: 340-341.
- Dobbs TE, Patel M, Waites KB, Moser SA, Stamm AM, Hoesley CJ 2006. Nosocomial spread of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and linezolid in a tertiary care medical center. *J Clin Microbiol* 44: 3368-3370.
- Esteban J, Nieto E, Calvo R, Fernandez-Robals R, Valero-Guillen PL, Soriano F 1999. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 518-521.
- Freney J, Duperron MT, Courtier C, Hansen W, Allard F, Boeufgras JM, Monget D, Fleurette J 1991. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 29: 38-41.
- Funke G, Bernard KA 2003. Coryneform gram-positive rods. In: PR Murray, EJ Barron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenover, *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., ASM Press Washington DC, p. 472-501.
- Funke G, Punter V, von Graevenitz A 1996. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2874-2878.
- Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 10: 125-159.
- Furtado GH, Mendes RE, Pignatari AC, Wey SB, Medeiros EA 2006. Risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteremia in hospitalised patients: an analysis of two case-control studies. *Am J Infect Control* 34: 447-451.
- Garner IS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes IM 1988. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Contr* 16: 128-140.
- Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA 2006. Comparison of antimicrobial spectra. In DN Gilbert et al. *The Sanford guide to antimicrobial therapy*, 36th ed., Antimicrobial Therapy Inc, Hyde Park, p. 53-55.
- Hughes WT, Flynn PM, Williams BG 1996. Nosocomial infection in patients with neoplastic diseases. In: CG Mayall, *Hospital epidemiology and infection control*, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 618-631.
- Knox KL, Holmes AH 2002. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerg Infect Dis* 8: 97-99.
- Lagrou K, Verhaegen J, Janssens M, Wauters G, Verbist L 1998. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance and antibiotic susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30: 7-15.
- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW 1977. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 296: 1305-1309.
- Martinez-Martinez L, Ortega MC, Suarez AI 1995. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 33: 1318-1321.
- Meyer DK, Reboli AC 2005. Others Corynebacteria and *Rhodococcus*. In: GL Mandell, R Dolin, JE Bennet, *Principles and practice of infectious diseases*, Churchill-Livingstone, New York, p. 2465-2478.
- Osterwalder B, Frei R, Gratwohl A, Reber H, Speck B 1986. Antibiotic-resistant Corynebacteria - a new problem of infection in immunosuppressed patients. *Schweiz Med Wochenschr* 116: 880-884.
- Oteo J, Aracil B, Alós JI, Gómez-Garcés JL 2001. Bacteriemias significativas por *Corynebacterium amycolatum*: un patógeno emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19: 103-106.
- Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Ezaki T, Kimura S 2006. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54: 109-114.
- Rozdzinski E, Kern W, Schmeiser T, Kurrle E 1991. *Corynebacterium jeikeium* bacteraemia at a tertiary care center. *Infection* 19: 201-204.
- Schiff H, Mücke C, Lang SM 2004. Exit-site infections by non-diphtheria corynebacteria in CAPD. *Perit Dial Int* 24: 454-459.
- Schoen C, Unzicker C, Stuhler G, Elias J, Einsele H, Grigoleit GU, Abele-Horn M, Mielke S 2009. Life-threatening infection caused by daptomycin-resistant *Corynebacterium jeikeium* in a neutropenic patient. *J Clin Microbiol* 47: 2328-2331.
- Sierra JM, Martinez-Martinez L, Vazquez F, Giralt E, Vila J 2005. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1714-1719.
- Thomson Jr RB 2007. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In: PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller, *Manual of clinical microbiology*, ASM Press, Washington DC, p. 485-514.
- van der Lelie H, Leverstein-Van Hall M, Mertens M, van Zaanen HC, van Oers RH, Thomas BL, von dem Borne AE, Kuijper EJ 1995. *Corynebacterium* CDC group JK (*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. *Scand J Infect Dis* 27: 581-584.

- Vanechoutte M, De Bleser D, Claeys G, Verschraegen G, De Baere T, Hommez J, Devriese LA, Riegel P 1998. Cardioverter-lead electrode infection due to *Corynebacterium amycolatum*. *Clin Infect Dis* 27: 1553-1554.
- von Graevenitz A, Frommelt L, Punter-Streit V, Funke G 1998. Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures. *Infection* 26: 36-38.
- Weiss K, Laverdière M, Rivest R 1996. Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 930-933.
- Zalas P, Mikucka A, Gospodarek E 2004. Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium amycolatum*. *Med Dosw Mikrobiol* 56: 327-334.
- Zinkernagel AS, von Graevenitz A, Funke G 1996. Heterogeneity within *Corynebacterium minutissimum* strains is explained by misidentified *Corynebacterium amycolatum* strains. *Am J Clin Pathol* 106: 378-383.

16.2 Artigo 2: Bacteremias causadas por espécies de corinebactérias não produtoras de toxina diftérica em pacientes atendidos no instituto nacional de câncer, Rio de Janeiro, Brasil

Conhecimentos prévios e objetivos

Apesar de espécies *Corynebacterium* não diftéricas estarem sendo cada vez mais reconhecidas como agentes etiológicos de infecções da corrente sanguínea, apenas alguns relatos lidaram com os aspectos clínicos, microbiológicos e epidemiológicos das infecções invasivas causadas pelas corinebactérias em países tropicais e em desenvolvimento, incluindo em pacientes com câncer. O objetivo deste estudo descritivo foi avaliar as infecções da corrente sanguínea, causadas por espécies de *Corynebacterium* não diftéricas em um Centro de Referência de Câncer-INCA, Rio de Janeiro, Brasil, durante dois períodos com intervalo de oito anos (de janeiro de 2003 a dezembro de 2004 e janeiro de 2012 a novembro 2013).

Métodos

A investigação comparativa do banco de dados do laboratório de microbiologia, os perfis clínicos e os resultados dos pacientes com câncer acerca das bacteremias causadas por *Corynebacterium*, em pacientes com cateteres venosos centrais Hickman, Port ou PICC silicone, poliuretano ou cateteres de curta permanência, foi investigada. Pacientes com pelo menos duas hemoculturas positivas para *Corynebacterium sp* foram considerados como tendo bacteremia. Espécies do gênero *Corynebacterium* foram isoladas a partir de amostras de sangue e identificadas através de métodos convencionais e automatizados durante o processamento laboratorial de rotina. As características clinico-epidemiológicas foram comparadas em dois períodos distintos entre intervalo de sete anos, buscando alterações na população atendida, na doença de base, na frequência das espécies e sensibilidade aos antimicrobianos.

Resultados

Durante os períodos de 2003-2004 ($n= 38$) e 2012-2013 ($n= 24$), foram investigados os casos de bacteremia causada por *Corynebacterium sp* em pacientes que apresentam tumores sólidos ($n= 34$), e doenças linfoproliferativas, incluindo linfoma de SNC ($n= 28$). Vinte e um pacientes estavam neutropênicos. A mediana da idade foi de 55,5 anos de idade (média de 37 anos) e a mediana do tempo médio de hospitalização foi de 16 dias (média de 24 dias). A maioria dos pacientes possuía cateteres venosos centrais ($n= 54$), 41 apresentaram infecções relacionadas ou associadas com o cateter, e 13 tiveram os cateteres removidos como a fonte

principal do processo infeccioso. Os episódios de infecções relacionadas ao cateter ($n= 18$) foram observados em silicone de longa permanência, ao passo que quatro pacientes tiveram contaminação em cateteres de poliuretano de curta permanência. Infecções associadas a cateteres foram observadas em sete pacientes em uso de cateter de silicone e em 12 pacientes com cateteres de poliuretano. Cateteres de silicone Hickmann apresentaram 7,2 infecções por 1000 cateteres/dia, enquanto cateteres de poliuretano 17,7 infecções/1000 cateteres/dias. As infecções que não estavam relacionadas à cateteres consistiram de 21 episódios de bacteremia secundária devido à disseminação de focos de infecção à distância ou bacteremia primária onde o cateter foi excluído como uma fonte de infecção. As espécies isoladas mais frequentes foram: *Corynebacterium amycolatum* ($n=31$) e *Corynebacterium jeikeium* ($n= 9$). Pacientes com bacteremia por *Corynebacterium* responderam bem à remoção do cateter e tratamento com vancomicina.

Conclusões:

As espécies de *Corynebacterium*, em especial *C. amycolatum* e *C. jeikeium* multirresistentes, foram capazes de causar infecções sanguíneas graves, em pacientes com tumores sólidos ou linfoproliferativos, submetidos à quimioterapia, radioterapia e/ou tratamentos cirúrgicos radicais. O comportamento agressivo da doença neoplásica pareceu aumentar o risco de infecção da corrente sanguínea pelas corinebactérias, bem como o tempo de internação hospitalar, além da utilização de cateteres venosos centrais. As principais mudanças clínico-epidemiológicas ocorridas do primeiro para o segundo período, foram a diminuição dos pacientes internados de 97,4% para 54,2% ($p < 0,001$) e do uso de cateteres venosos de 94,7% para 75,0% ($p = 0,02$). Entretanto no segundo período, houve um maior número de episódios febris (13,2% para 37,5%; $p = 0,03$) e hipotensão arterial.

Title page

**Bloodstream infections caused by
non-diphtherial *Corynebacterium* species in a
Cancer Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil**

*Carlos Alberto de Souza Martins^{1,3}, Ricardo Vianna de Carvalho^{1,3}, Juliana Nunes Ramos^{1,4},
Lincoln Oliveira Sant'Anna¹, Mônica Cristina Souza¹, Cíntia Silva dos Santos¹, Silvana
Vargas Superti³, Prescilla Emy Nagao², Raphael Hirata Junior¹, Ana Luíza Mattos-
Guaraldi^{1*}*

¹ Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University - UERJ, Rio de Janeiro, RJ– LDCIC/FCM/UERJ. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil;

² Roberto Alcântara Biology Institute, Rio de Janeiro State University - UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

³ National Cancer Institute - INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

⁴ Oswaldo Cruz Institute and National Institute for Quality Control in Health, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Keywords: *Corynebacterium*, bacteremia, cancer, catheter, antimicrobial resistance, *Leifsonia aquatica*

*Corresponding author at: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas. Av 28 de Setembro 87-Fundos 3 andar- Vila Isabel- Disciplina de Microbiologia e Imunologia. CEP 20551-030 - Rio de Janeiro, RJ – Brazil. Tel: (21) 2868-8280. Fax: (21) 2868-8376.

E-mail address: guaraldi@uerj.br

Abstract

Background and aims: Although non-diphtherial *Corynebacterium* species are increasingly being recognized as a cause of bloodstream infections, only a few reports have dealt with the clinical, microbiological and epidemiological aspects of invasive infections caused by corynebacteria in tropical and developing countries, including cancer patients. The objective of this descriptive study was to assess bloodstream infections caused by non-diphtherial *Corynebacterium* species in a Cancer Reference Center - INCA, Rio de Janeiro, Brazil during eight-year intermission periods (from January, 2003 to December, 2004 and January 2012 to November 2013)

Methods: A comparative investigation of the microbiology laboratory database, clinical profiles and outcomes of cancer patients with *Corynebacterium* bacteremia, receiving venous central Hickman, Port or PICC silicone, or polyurethane short-term catheters, was conducted. Patients with at least two positive blood cultures for *Corynebacterium* bacteria were considered to have bacteremia. *Corynebacterium* species were isolated from blood samples and identified by conventional and automatized methods during the laboratory routine processing.

Results: During the periods 2003-04 ($n=38$)/2012-13 ($n=24$), the cases of bacteremia caused by *Corynebacterium sp* were observed in patients presenting solid tumors ($n= 34$), CNS tumor and lymphoproliferative disorders (LPDs), including CNS lymphoma ($n=28$). Twenty-one patients were neutropenic. The median age was 55.5 years-old (mean 37 years-old) and median length of hospitalization was 16 days (mean 24 days). Most of the patients had central venous catheters ($n=54$); 41 had catheter-related or associated infections, and 13 had the catheters removed as the major source of infection. Episodes of catheter-related infections ($n= 18$) were observed in long term silicone catheters, whereas four patients had short term polyurethane catheters. Catheter associated infections were observed in 7 patients using silicone catheters and 12 polyurethane catheters. Hickmann silicone catheters had 7.2 infections per 1000 catheters/days, and polyurethane catheters 17.7 infections/1000 catheters/days. Non-related catheter infections consisted of 21 episodes of secondary bacteremia due to dissemination from distant foci of infection or a primary bacteremia where catheter was excluded from a source of infection. The most frequent isolated species were: *Corynebacterium amycolatum* ($n= 31$) and *Corynebacterium jeikeium* ($n= 9$). Patients with *Corynebacterium* bacteremia responded well to catheter removal and treatment with vancomycin. The main clinical and epidemiological changes from the first to the second period were the reduction of inpatients 97.4% to 54.2% ($p <0.001$) and the use of catheters 94.7% to 75.0 % ($p = 0.02$). Related to the second period, there was a higher rate of febrile episodes (13.2% to 37.5%, $p = 0.03$) and hypotension.

Conclusions: *Corynebacterium* species, in special multi-resistant *C. amycolatum* and *C. jeikeium*, caused severe bloodstream infections in both lymphoproliferative and solid tumor cancer patients submitted to chemotherapy, radiotherapy and/or radical surgical treatments. The aggressive behavior of the neoplastic disease seems to increase the risk for corynebacterial bloodstream infection, as well as the length stay of hospitalization, and the use of CVCs.

Introduction

Non-diphtherial *Corynebacterium* species are an increasing cause of human infection. Though frequently discarded as contaminants, the isolation of these pathogens from clinical materials such as biopsies from tissues, including bone fragments and cardiac valves, synovial aspirates, liquor, and blood must be treated with special attention, especially when obtained from immunosuppressed patients and/or patients under the use of indwelling venous catheters (Clarridge & Spiegel 1995; Martins 2008; Meyer & Riboli 2009; Diez-Aguilar *et al.* 2013). Central venous catheters (CVCs), often needed by cancer patients, can be the source of bacteremia. Important issues, including the pathogenic potential of different species of corynebacteria and the risk of febrile neutropenia in patients using CVCs has been rare and often controversial (Pauw & Verweij 2005).

The case series of infection due to *Corynebacterium* spp. emphasize the clinical importance of multiresistant and pathogenic species such as *Corynebacterium jeikeium* (Wang *et al.* 2001), *Corynebacterium striatum* (Baio *et al.* 2013; Fernandez Guerrero *et al.* 2013), *Corynebacterium urealyticum* (López-Medrano *et al.* 2008; Pagnoux *et al.* 2011) and more recently, the involvement of *Corynebacterium amycolatum* (Rizvi *et al.* 2013), *Corynebacterium propinquum* (Diez-Aguilar *et al.* 2013) and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (Camello *et al.* 2009; Nishiyama *et al.* 2013) in health care associated infections. However, the treatment of immunosuppressed patients under radiotherapy, chemotherapy and/or radical surgical treatment in *Corynebacterium* infection-related catheter and line maintenance, using both glycopeptide or non-glycopeptide antibiotics (Beekmann & Henderson, 2005; Donnelly & Pauw 2005; Viscoli & Castagnola, 2009; Ghidde *et al.* 2010; Finberg, 2011) was scarcely investigated. Moreover, only a few reports have dealt with the epidemiological aspects of both community and hospital acquired infections caused by corynebacteria in tropical and developing countries (Rizvi *et al.* 2011), including cancer patients (Mattos-Guaraldi *et al.* 2001; Camello *et al.* 2003; Martins *et al.* 2009).

The aim of this descriptive study was to assess bloodstream infections caused by non-diphtherial *Corynebacterium* species and clinical and epidemiological aspects at two intervals in a Cancer Reference Center -INCA, Rio de Janeiro, Brazil during seven-year intermission periods (from January, 2003 to December, 2004 and January 2012 to November 2013).

Materials and Methods

Setting study - A comparative investigation of the microbiological and clinical profiles and outcomes of cancer patients with *Corynebacterium* bacteremia, receiving venous central Hickman, Port or PICC silicone, or polyurethane short-term catheters, was conducted from January, 2003 to December, 2004 and January 2012 to November 2013. Only one episode was recorded per cancer patient. Patients with at least two positive blood cultures for *Corynebacterium* were considered to have *Corynebacterium* bacteremia.

The study protocol was approved by The Institutional Review Committee/Ethic commission, Instituto Nacional do Cancer (INCA) / Rio de Janeiro – Brazil [CEP number 64/10 e registrado no Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)].

Diagnosis of infection - The hospitalized patients were monitored by at least one member of the HICC as a part of the antimicrobial vigilance routine through daily microbiology laboratory charts. Ambulatory patients were identified by the dressing nurses committee, catheter ambulatory (both for children and adults) and bacteriological charts. The infectious processes were classified according to the Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections (O'Grady *et al.* 2011) and to the Surgical Site Infections of Centers for Disease Control-USA (Mangram *et al.* 1999). Patients with positive blood cultures were considered as infected when the assistant physician regarded the clinical condition associated to fever as important and initiated the specific antimicrobial therapy. The infectious episode was defined with the first positive blood culture for *Corynebacterium* (index culture), and the day of collection as the onset of the infectious process. Patients with signs and symptoms of bloodstream infection and positive blood culture for *Corynebacterium sp* were classified as presenting primary bacteremia. When primary bacteremia occurred after infection of ostium or tunnel, with a differential time for positivity of blood culture, or with a colony count higher than 15 CFU (after catheter's removal) (Maki *et al.* 1977), the bacteremia was classified as catheter-related (CR-BSI). Catheter-associated infection (CA-BSI) was classified when the micro-organism of another site of infection did not correspond to the micro-organism isolated from the blood sample obtained from the catheter. Secondary bacteremia was considered when there was an infectious process in a distant focus and considered as undetermined when there was more than one distant site of infection. Lower respiratory tract infections were defined along with the presence of newly or progressive pulmonary infiltrate, consolidation or cavitary lesion, observed after assessment of thoracic radiographs. Febrile neutropenic

patients with initial thoracic normal radiograph, the emergence of pulmonary infiltrate during the recovery of bone marrow transplantation was considered as pneumonia with secondary bacteremia. Secondary bacteremia due to urinary tract infection was defined in the presence of a positive culture from a urine sample, independently of the bacterial count in the presence of signs and symptoms of urinary infection including dysuria, urinary frequency and urgency. Presence of pyuria was required for non-neutropenic patients (Sickles *et al.* 1975; Viscoli *et al.* 2005).

Microbiological analysis - Microbiological data were obtained from the records of the Laboratory of Microbiology, and from clinical record of each patient, and from the Joint Commission of Infection Control and Surveillance – HC1/INCA.

The clinical isolates were identified by the Laboratory of Microbiology at the National Cancer Institute (HC1 – INCA) – RJ, Brazil. Briefly, two sets of blood samples were obtained from peripheral vein access and from catheter when present, and inoculated into two flasks each of Bactec Plus anaerobic/aerobic, and incubated in a Bactec 9240 System (Becton-Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, USA). Positive blood cultures were plated into Columbia blood agar plates (5% defibrinated sheep blood, Difco Laboratories – BD, Detroit-MI) and incubated for 48h/37°C. Bacterial colonies on agar plates of Irregular Gram-positive rod (BGPIs) were observed for morphological features of corynebacteria, hemolysis and pigment formation. Phenotypic profiles were determined by using API CoryneSystem strips (BioMérieux, Lyon, France), and numerical characterization was converted after consultation of apiweb (www.apiweb.biomerieux.com). The following conventional biochemical tests were performed by methods previously described (Funke & Bernard, 2007; Camello *et al.* 2009): Catalase, motility, lipolytic and pyrazinamidase (PYZ) activity, nitrate reduction, urease, fermentation of glucose, maltose, sucrose, manitol, xilose, oxidation and fermentation tests, and CAMP reaction using a beta-lysin-producing *Staphylococcus aureus* strain.

Antimicrobial susceptibility profiles to seven antimicrobial agents (Oxoid, Hampshire, UK) presented in **Table 3** were determined according to the methodologies previously described (Martinez-Martinez *et al.* 1995; Funke *et al.*, 1997; Camello *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2009; CLSI, 2007).

Results

In this investigation 62 cases of bacteremia due to *Corynebacterium* spp. were identified in cancer patients of INCA – Rio de Janeiro: 38 cases during the period of 2003-04 and 24 cases eight years later, during the period of 2012-13. During this study a total of 50 hospitalized patients and 12 outpatients were attended in the Cancer Reference Center located at Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. Clinical and epidemiological aspects of cases of bacteremia in inpatients during the periods 2003-04 ($n= 37$)/2012-13 ($n= 13$) were presented in **Tables 1** and **2**. From a total of 62 patients, 25 had lymphoproliferative diseases, 23 patients had adult's solid tumors, 9 solid pediatric tumors and 5 central nervous system tumor. Distribution by gender revealed 33 patients from female gender (53.2%), and 29 males (46.8 %). The mean age was 37 and median 55.5 years-old (from 7 months to 85 years-old), twenty patients with less than 16 years old (median 8 years-old), and 15 older than 60 years-old (median 66 years-old). Median hospital stay was 16 days.

From 62 cancer patients diagnosed with bacteremia due to *Corynebacterium* spp., 54 patients had central venous catheters (CVC), included one with hemodialysis catheter, and eight with peripheral venous access. From the patients with CVC, 32 had long term catheters (24 Hickmann, 6 Port and 2 peripheral inserted venous catheter – PICC). The 22 patients with short-term central-venous catheters with transcoetaneous insertion, 21 were using polyurethane central venous catheters, and one with hemodialysis catheters. The 13 silicone Hickmann catheters totalized 1394 catheters-days (mean of 107.2 days, with 7.2 infections/1000 catheters day). From 16 polyurethane CVC accompanied prospectively, the dwelling time varied from 4 to 20 days, from a total of 169 catheter-day, with a mean of 10.6 days (17.7 infections per 1000 catheter-day).

Corynebacteria more frequently isolated from bacteremia comprised: *C. amycolatum* ($n= 31$) and *C. jeikeium* ($n= 9$). Other eight *Corynebacterium* species were isolated from 22 patients: *C. afermentans* ($n= 5$), *C. propinquum* ($n= 4$), *C. sp* ($n= 4$), *C. argentoratense* ($n= 3$), *L. aquatica* ($n= 2$), *C. minutissimum* ($n= 2$), *C striatum* ($n= 1$) and *C. urealyticum* ($n= 1$) (**Table 2**). Most of *C. amycolatum* strains were isolated during the period of 2003-04. Cases of bacteremia due to *L. aquatica* ($n=02$) were observed only during the period of 2003-04 while cases of bacteremia due to *C striatum* ($n= 01$) and *C. urealyticum* ($n= 01$) were observed only during the period of 2012-13 (**Figure 1**).

Results presented in **Table 2** also indicated *C. amycolatum* as the predominant species in both catheter-related (CR-BSI; $n= 11$) or associated infections (CA-BSI; $n= 10$) and in

secondary or undetermined causes of bacteremia ($n= 10$). Microorganisms isolated from silicone ($n= 25$) CVCs, included: *C. amycolatum* ($n= 11$), and *C. jeikeium* ($n= 5$). *C. afermentans* ($n= 2$), *C. propinquum* ($n= 2$), *C. argentoratense* ($n= 1$), *C. striatum* ($n= 1$), *C. urealyticum* ($n= 1$), *C. spp* ($n= 1$) and *L. aquatica* ($n= 1$). Infections related or associated to polyurethane catheters ($n= 16$) were predominantly caused by *C. amycolatum* ($n= 10$), followed by *C. jeikeium* ($n= 2$), *C. minutissimum* ($n= 2$), *C. argentoratense* ($n= 1$) and *C. spp* ($n= 1$).

The clinical characteristics of malignant diseases whose *C. amycolatum* was isolated from bacteremias ($n= 31$), consisted of 12 patients with lymphoproliferative diseases, 19 solid tumors, included 14 adult solid tumors, 4 with pediatric solid tumors, and one brain tumor. Eight patients with *C. amycolatum* infection had febrile neutropenia. One patient was using hemodialysis catheter, and 26 with CVC, included 14 with long term and 12 with short term catheters. *C. amycolatum* was the species isolated from three cases, *C. afermentans* three cases, *C. propinquum* one case and *C. minutissimum* one case of infections related to peripheral venous accesses involved in this study. Three patients presented catheter-related septic thrombophlebitis, one with actinic proctitis, one with post-transplant veno-occlusive hepatic disease, and one patient with neutropenic enteritis accompanied of diffuse peritonitis and stress gastric ulcer. Amongst the secondary or undetermined bacteremia not related to catheter infection, *C. amycolatum* was isolated from two urinary sepsis, and from one patient with shoulder osteosarcoma necrosis submitted to amputation (Berger surgery).

C. jeikeium was isolated from eight patients with lymphoproliferative diseases (three lymphomas, four leukemias and one myeloma, patients), and one patient with solid tumor. Seven patients presented neutropenia during the blood collection. Two patients had catheter-associated, and five catheter-related infections. Secondary bacteremia caused by *C. jeikeium* was due to a case of pneumonia and one undetermined infection. Three patients had persistent infection by *C. jeikeium*.

C. afermentans was isolated from a teenager (girl, 14 years-old) with acute lymphoid leukemia, presenting a septic thrombosis related to a Hickmann catheter, and from four adults, one male 40 years-old which received an autologous hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of non Hodgkin lymphoma, and developed a catheter-associated infection with pulmonary involvement, and three patients with colon-rectal diseases with peripheral venous catheters.

C. propinquum was isolated from four patients, one lymphoproliferative disease and three solid tumors. Two CR-infection (LMA e Wilms tumor with vanco-lock), one CA-

infection (polyurethane) with systemic infection, *C. propinquum* was implicated in a secondary bacteremia in a patient with a palliative colostomy due to intestinal obstruction by a sigmoid tumor, and one children 9 years-old with hemangioma and peripheral venous catheter.

C. argentoratense was isolated from three patients: 1- one (27 years-old) had non-Hodkin lymphoma and febrile neutropenia, 2- a patient (85 years-old) with catheter-related bacteremia after rectal resection. Afterward, this patient also had pneumonia which was isolated *C. minutissimum*, and 3- from a pediatric patient with Ewing sarcoma and CR-infection (Port and vanco-lock).

C. minutissimum was isolated from a catheter tip (positive for Maki test) of a non-neutropenic patient (female, 25 years-old) with Hodkin lymphoma, and superior vena cava syndrome with a femoral polyurethane catheter. The patient died from progression of lung neoplasm disease. A second case was a patient with infection palate tumor and peripheral venous catheter.

C. striatum was isolated from an adult patient with a colorectal infection and a peripherally inserted venous catheter-associated infection.

C. urealyticum was isolated from a non-neutropenic child with acute lymphoid leukemia with a Hickmann catheter-related infection. The catheter was preserved after lock treatments with amikacin and vancomycin.

Corynebacterium sp. was isolated from four patients; two children with solid tumors: 1- a glioma with non-infected Hickmann catheter with a secondary sepsis due to pneumonia, and 2- a child with retinoblastoma and with a Hickmann catheter- associated infection and suppurative otitis media; and two adults with lymphoproliferative disease (myeloid acute leukemia, and non-Hodkin lymphoma), both cases were polyurethane catheter-associated infections (one in a non-neutropenic patient with a thrombosis of the cavernous sinus, and one in a neutropenic patient with orbital cellulitis).

Leifsonia aquatica was isolated form: 1- an adult patient with melanoma, using a polyurethane catheter and with a undetermined infection, and 2- from a neutropenic child with Wilms tumor, and septic thrombophlebitis with a Hickmann catheter-related infection.

The antimicrobial sensitivity profiles of the 62 *Corynebacterium sp.* strains isolated from bacteremia is presented in **Table 3**. In general, the *Corynebacterium* isolates from blood cultures presented a reduced susceptibility to all antimicrobial agents tested, except vancomycin and linezolid. *C. amycolatum* demonstrated variable sensitivity to the antimicrobial agents tested, being more resistant to ciprofloxacin (48,4%), penicillin (71%)

and erythromycin (55%) while *C. jeikeium* strains were resistant to all antimicrobial agents, except to vancomycin and linezolid. Vancomycin and linezolid were the only antimicrobials agents with a wide activity to *Corynebacterium* isolates with 100% susceptibility.

Discussion

An earlier study demonstrated that *Corynebacterium* spp. was isolated from varied clinical sites of cancer patients from the Cancer Reference Center -INCA, Rio de Janeiro, Brazil. During a period of five years; 86% of the isolates were obtained from patients classified as infected and 77% were hospitalized (Martins *et al.*, 2009).

In the present study we documented a total of 62 cases of bloodstream infections caused by *Corynebacterium* spp. that occurred in cancer patients, including 21 with neutropenia, from January 2003 to December 2004 and from January 2012 to November 2013. The majority of the patients were hospitalized for extended time and using intravenous devices (long term, short term or dialysis catheters). During the period January/2003 to December 2004, 38 isolates were obtained from blood cultures of a total 315 patients infected with *Corynebacterium* spp. In that opportunity the incidence of bacteremia due to corynebacteria among infected patients by Gram-positive organisms reached to 12.1%, a percentage three times higher than that found by Zinner (1999) (3.7%) from the total of the Gram-positive species from blood cultures of neutropenic patients.

From January 2012 to November 2013, 35 isolates of 24 patients were obtained from blood cultures of a total 2220 positive blood cultures positive of the patients infected with *Corynebacterium* spp. In that opportunity the incidence of bacteremia due to corynebacteria among infected patients reached to 1.6%

The insertion of CVC is important for the antineoplastic intervention, though it adds risk factors for bacterial and fungal systemic infections. The characterization of the origin of infection in patients with CVC is complicated in the absence of signs of inflammation in the local of the catheter insertion or when the process is localized in deeper veins (deep thrombophlebitis). The definition of catheter infection is usually made upon differential time of positivity of blood cultures (Blot *et al.* 1999; Raad *et al.* 2004) or by the colony counts of rolling the catheter tip (> 15 CFU) after removal (Maki *et al.*, 1977). In the present study, all patients were using intravenous devices 54 CVCs, (Hickmann 24, Port 6, PICC 2) of silicone and 17 polyurethane CVCs, one hemodialysis catheter and 8 peripheral accesses). *C. amycolatum* was the major species isolated from intravenous apparatus (21 from both catheter related or associated infections of a total of 41 catheter infections, 3 peripheral venous access, one hemodialysis catheters), revealing the predisposition to adhere to catheters or other non-biotic surfaces inserted in cancer patients. In addition, this species was also isolated from 10 cases with secondary or undefined bacteremia in patients using CVCs.

As depicted, *C. amycolatum* was the major species found in blood cultures (31/62 isolates, 50%), followed by *C. jeikeium* (09/62 isolates, 14.5). In a study conducted earlier (Martins *et al.* 2009), *C. amycolatum* was also the major species found mostly in clinical materials of patients with solid tumors, whereas *C. jeikeium* was mainly isolated from neutropenic patients with lymphoproliferative disorders. Presently, the prevalence of solid tumors ($n= 34$, 54.8%) was higher than lymphoproliferative diseases ($n= 28$, 45.2%), and may justify the isolation of *C. amycolatum* rather than *C. jeikeium*, though the prevalence of *C. amycolatum* was much higher than 9.7%. *C. amycolatum* was also the predominant species isolated from hospital infections in India, corresponding to 35.9% of the total of the isolates (Reddy *et al.*, 2012), as observed in this study to hospital acquired blood stream infections in cancer patients. An interesting finding in this investigation was the predominance of *C. amycolatum* in all types of catheter infections during the first period, 2003-2004, and the modification of the isolation of this species during the period of 2012-2013, with maintenance of *C. amycolatum* infections in polyurethane catheters, Port and peripheral accesses, with disappearance in Hickmann catheters infections. In the second period *C. jeikeum* remained associated to lymphoproliferative disorders, neutropenic disorders, and long term catheter infections independently of the type of catheter.

The antimicrobial resistance exhibited by *C. amycolatum* may be as concerning as observed in *C. jeikeium*, and the underestimation and the delay in diagnosis may reflect in the mortality of blood stream *C. amycolatum* infection in cancer patients.

Resistance to penicillin and erythromycin, chemotherapeutics frequently used in the treatment of infections caused by corynebacteria, is concerning especially due to the treatment of immunosuppressed outpatients infected by *Corynebacterium* spp. Resistance of *C. xerosis*, *C. jeikeium* and *C. striatum* to erythromycin was shown to be mediated by *ermX* gene (Ortiz-Perez *et al.*, 2010) though other genes may be involved. The investigation/surveillance of the mechanisms of resistance displayed by these pathogens to both antimicrobial agents is necessary in order to monitor the circulation of resistance genes among hospital, and community environments.

Although *Corynebacterium* spp. may cause opportunistic infections, in many laboratories this species is interpreted as contaminants from skin, human mucosa or the environment; the isolates frequently demonstrate multiresistance to β -lactam, macrolides and fluoroquinolones antibiotics (Soriano *et al.* 1995; Funke & Bernard, 2007; Martins *et al.* 2009). Herein, resistance to ciprofloxacin was observed by 31(50%) of corynebacterial blood isolates. Quinolones resistance displayed by *C. amycolatum* is generally related to mutation in

gyrA gene (Sierra *et al.* 2005; Yoon *et al.* 2011) and adds a new complication to the empirical treatment during the neutropenia.

In cancer patients the neutropenia may be induced by both the underlying disease and by chemotherapy, and fever is first warning sign of infection; the empirical antimicrobial approach is complicated when a Gram-positive microorganism is detected being necessary the administration of a third antimicrobial agent, increasing the toxicity of the general treatment. In this investigation, corynebacterial species were isolated from blood cultures of twenty patients with neutropenia: 8 *C. amycolatum* (40%), 7 *C. jeikeium* (35%), 1 *C. argentoratense*, 1 *C. propinquum*, 1 *C. afermentans*, 1 *C. spp* and 1 *L. aquatica* isolates.

L. aquatica is an aquatic coryneform rod that is capable of forming biofilms in environmental water sources. It has been isolated from samples of distilled water, from municipal water supplies and water from private wells. Information about the pathogenicity and clinical relevance of *L. aquatica* is scarce and only few reports regarding the isolation of this species in human clinical samples have been published (Porte *et al.* 2012; Han *et al.* 2013). Recently, a case of catheter-related bloodstream infection in a hemodialysis patient was described (Porte *et al.* 2012). Although the strain displayed reduced sensitivity to vancomycin, the clinical outcome was favorable after catheter removal and intravenous treatment with this antibiotic. In this study, *L. aquatica* caused bloodstream infection in two cancer patients: (i) a non-neutropenic with melanoma under chemotherapeutic treatment and fever of unknown origin; (ii) a neutropenic child (6 years-old) with Wilm's tumor, with a Hickmann's ostium catheter-related infection with septic thrombophlebitis. *L. aquatica* strains were susceptible to all antimicrobial agents tested in this investigation, with exception to one *L. aquatica* isolate that was resistant to erythromycin. In contrast to data reported in Chile by Porte and co-workers (2012), reduced sensitivity to vancomycin was not currently observed in Rio de Janeiro. Thus, our report gives further evidence of the capability of this aquatic bacterium to cause human infection, including in cancer patients.

There were important clinical and epidemiological changes from the first to the second period, including the reduction of inpatients 97.4% to 54.2% ($p < 0.001$) and the use of catheters 94.7% to 75.0% ($p = 0.02$). Related to the second period, there was a higher rate of febrile episodes (13.2% to 37.5%, $p = 0.03$) and hypotension.

Conclusions

The epidemiology of infections in neutropenic patients has been changed in the last 40 years, as the data obtained from the International Antimicrobial Therapy Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). The frequency of the isolation of Gram-positive species in blood cultures has risen from 28% to 67% from the EORTC-I to EORTC IX (a period of 17 years) in neutropenic patients. The investigation of blood cultures at INCA, showed that Gram-positive microorganisms corresponded to 50.3% of the isolates in period of five years (2000-2004). Although the infections caused by *Corynebacterium sp* have the major index in populations of tropical areas, publications remain scarce (Camello *et al.* 2003; Camello *et al.* 2009; Rizvi *et al.* 2011; Baio *et al.* 2013). Data indicated an increase of isolation of *C. amycolatum* and *C. jeikeium* in immunocompromised patients. In immunocompetent patients *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. urealyticum* e *C. afermentans*, alongside *C. minutissimum* and *C. jeikeium* are frequently isolated. The diverse species have both natural and acquired resistance markers to antimicrobial agents, and hamper the empirical treatment of patients (Rizvi *et al.* 2011).

Due to its higher isolation from cancer patients other studies are necessary to investigate the pathogenic properties of *C. amycolatum*, since immunosuppressed individuals is raising in our society due to the increase of medical interventions including transplants, cancer patients, AIDS patients, and other medical circumstances whose immunosuppression is needed to achieve the improvement of the quality of life in patients with chronic diseases; situations where *Corynebacterium sp*, in special *C. amycolatum*, may express its plenty pathogenic properties (Oteo *et al.* 2001).

Corynebacterium species, in special multi-resistant *C. amycolatum* and *C. jeikeium*, may be repeatedly found over years in the nosocomial environment as the etiologic agent of severe blood stream infections in both lymphoproliferative and solid tumor cancer patients submitted to chemotherapy, radiotherapy and/or radical surgical treatments. The aggressive behavior of the neoplastic disease seems to increase the risk for corynebacterial blood stream infection, as well as the length stay of hospitalization, and the use of indwelling venous catheters.

Conflicts of interest

The authors declare there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Financial support of CAPES, FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ, INCA-RJ e Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD (CAPES/MEC) e PAPD (FAPERJ/CAPES).

References

- Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TC, Hirata R Jr, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108: 23-29.
- Beekmann SE, Henderson DK. Infections caused by percutaneous intravascular devices. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.
- Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet*. 1999;354:1071-7.
- Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Non-diphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2003;34:39-44.
- Camello TCF, Souza MC, Martins CAS, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. *Lett Applied Microbiol* 2009; 48; 458–464.
- Clarridge JE, and Spiegel CA. *Corynebacterium* and Miscellaneous Irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*. In Murray P.R. Ed in Chief, Barron EL, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed, Washington, DC: ASM Press, 1995.
- CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute (2007) *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, approved guideline. CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7:4-6).
- Diez-Aguilar M, Ruiz-Garbajosa P, Fernandez-Olmos A *et al*. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 769-772.
- Donnelly JP, Pauw BE. Infections in the immunocompromised host: general principles. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.
- Fernandez Guerrero ML, Robles I, Nogales MC, Nuevo D. *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial drug-resistant endocardial pathogen. *J Heart Valve Dis* 2013; 22: 428-430.
- Finberg Robert. Infections in Patients with Cancer. In Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18 ed. New York: McGraw-Hill, 2011.
- Funke G, Bernard KA. Coryneform gram-positive rods. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.
- Funke G, Pünter V, von Graevenitz A. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Agents Chemother*. 1996 Dec;40(12):2874-8.
- Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE 3rd, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:125-59. Review.

- Ghide S, Jiang Y, Hachem R, Chaftari AM, Raad I. Catheter-related *Corynebacterium* bacteremia: should catheter be removed and vancomycin administered? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:153-6.
- Gomes DLR, Martins CAS, Santos LS, et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol*. 2009;58:1419-27.
- Han L, Lei J, Wang X, Guo L, Kang Q, He L, Xu J. Septicemia caused by *Leifsonia aquatica* in a healthy patient after retinal reattachment surgery. *J. Clin. Microbiol*. 2013 51:11 3886-3888.
- Katsikogianni M and Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*. 2004;8:37-57.
- López-Medrano F, García-Bravo M, Morales JM, 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. *Clin Infect Dis*. 2008;46:825-30.
- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous catheter-related infection. *N Engl J Méd*. 1977;296:1305-9.
- Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999;20:250-78.
- Martínez-Martínez L, Ortega MC, Suárez AI. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1318-21.
- Martínez-Martínez L, Suárez AI, Rodríguez-Baño J, Bernard K, Muniáin MA. Clinical significance of *Corynebacterium striatum* isolated from human samples. *Clin Microbiol Infect*. 1997;3:634-9.
- Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five years study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:905-13.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Camello TCF, Pereira GA, Hirata R Jr, Halpern M. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev Argentina de Microbiol*. 2001;33:96-100.
- Meyer DK, Riboli AC. Others Coryneform bacteria and *Rhodococcus*. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th Ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.
- O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, et al. and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (Appendix 1). Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections. *Clin Infect Dis*. 2011;52:e162–93.
- Oteo J, Aracil B, Alós JI, Gómez-Garcés JL. Bacteriemias significativas por *Corynebacterium amycolatum*: un patógeno emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001;19:103-7.

- Ortiz-Pérez A, Martín-de-Hijas NZ, Esteban J, Fernández-Natal MI, García-Cía JI, Fernández-Roblas R. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb. Drug Resist.*; 16: 273-277.
- Pagnoux C, Bérezné A, Damade R, et al. Encrusting Cystitis Due to *Corynebacterium urealyticum* in a Patient with ANCA-Associated Vasculitis: Case Report and Review of the Literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2011;41:297-300.
- Pauw BE, Verweij PE. Infections in patients with hematologic malignancies. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.
- Porte L, Soto A, Andrighetti D, Dabanch J, Braun S, Saldivia A, Flores JC, Wozniak A, García P, Weitzel T. Catheter-associated bloodstream infection caused by *Leifsonia aquatica* in a haemodialysis patient: a case report. *J Med Microbiol* 2012; 61 (6) 868-873.
- Raad I, Hanna HA, Alakech B, et al. Differential time to positivity: a useful method for diagnosing catheter-related bloodstream infections. *Ann Intern Med.* 2004;140:18-
- Reddy BS, Chaudhury A, Kalawat U, Jayaprada R, Reddy G, Ramana BV. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (diphtheroids). *Indian J Med Microbiol.* 2012;30:52-7.
- Rizvi M, Khan F, Raza A, et al. *Coryneforms* the opportunistic pathogens: an emerging challenge for immunocompetent individuals. *American-Eurasian Journal of Scientific Research.* 2011;6:165-71.
- Rizvi M, Rizvi MW, Shaheen, et al. Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical site infections in a tertiary care hospital of North India. *J Infect Public Health.* 2013;6:283-8.
- Sato K, Uchiyama M. *Corynebacterium jeikeium* bacteraemia and pulmonary infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. *BMJ Case Rep.* 2012 20;2012.
- Sickles EA, Greene WH, Wiernik PH. Clinical presentation of infection in granulocytopenic patients. *Arch Intern Med.* 1975;135:715-9.
- Sierra JM, Martinez-Martinez L, Vazquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1714-9.
- Soriano F, Zapardiel J, Nieto E. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:208-14.
- van der Lelie H, Leverstein-Van Hall M, Mertens M, et al. *Corynebacterium* CDC Group JK (*Corynebacterium jeikeium*) Sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. *Scand J Infect Dis.* 1995;27:581-4.
- Viscoli C, Castagnola E. Prophylaxis and empirical therapy for infection in cancer patients. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.
- Viscoli C, Varnier O, Machetti M. Infections in patients with febrile neutropenia: epidemiology, microbiology, and risk stratification. *Clin Infect Dis.* 2005;40 Suppl 4:S240-5. Review.

- Wang CC, Mattson D, Wald A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:445-9.
- Weiss K, Labbé AC, Laverdière M. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clin Infect Dis*. 1996;23:1246-8. Review.
- Widmer AF., Intravenous-related infections. In: Wenzel PR. Ed. *Prevention and Control of Nosocomial Infections*. 3th ed, Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1997.
- Yoon S, Kim H, Y Lee, Kim S. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean J Lab Med*. 2011;31:47-8.
- Zinner SH. Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: emphasis on gram-positive and resistant bacteria. *Clin Infect Dis*. 1999;29:490-

Table 1. Clinical and epidemiological aspects of 62 cases of bloodstream infections caused by non-diphtherial *Corynebacterium* species in a Cancer Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil

Characteristics	January 2003 to December 2004		January 2012 to November 2013		p value
	n= 38	%	n= 24	%	
Inpatients	37	97.4	13	54.2	< 0,001
Central venous catheter	36	94.7	18	75.0	0,02
Antimicrobial utilization	34	89.5	22	91.2	0,78
Female gender	21	55.3	12	50.0	0,69
Antineoplastic chemotherapy	21	55.3	16	66.7	0,37
Relapse tumor aggressive behavior	19	50.0	17	70.8	0,11
Karnofsky <70%	18	47.4	15	62.5	0,24
Bedridden >50% do dia	16	42.1	11	45.8	0,77
Neutropenia <1000mm ³	12	31.6	9	37.5	0,63
Radiotherapy	10	26.3	9	37.5	0,35
Uremia (Creatinine >2 mg%)	9	23.7	3	12.5	0,28
30 days mortality (F up n=45)	(n=21) 7	33.3	(n=24) 6	25.0	0,54
Previous surgery >30 dias	7	18.4	8	33.3	0,18
Pulmonary thromboembolism	7	18.4	1	4.2	0,10
Corticoid therapy (predinisona >40mg/day)	6	15.8	5	20.8	0,61
Fever (temperature >38°C)	5	13.2	9	37.5	0,03
Hypotension (S<90 mmHg)	5	13.2	8	33.3	0,06
Diabetes (Glicemy > 200 mg%)	4	10.5	1	4.2	0,37
Mucositis > 3 (NCI scale)	4	10.5	-	-	-
Upper vena cava syndrome	3	7.9	-	-	-
Tracheotomy	3	7.9	2	8.3	0,95
Cardiopathy	2	5.3	1	4.2	0,85
Suppuration wound infection (n=18)	(n=12) 2	16.7	(n=6) 1	16.7	1,00
Graft versus host disease (n=4)	2	50.0	-	-	-

Table 2. Total number of *Corynebacterium* species isolated from bloodstream infections caused by non-diphtherial *Corynebacterium* species in patients of a Cancer Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil during the periods 2003-04 (n=38)/2012-13 (n=24)

Microorganisms	Total (%) 2003-04+2012-13	Lymphoproliferative disorders*	Solid tumors**	CR-BSI†		CA-BSI†		Secondary or undetermined bacteremia**
				Silicone	Polyurethane	Silicone	Polyurethane	
<i>C. amycolatum</i>	31 (50.0)	10/2	15/4	8/1	2/0	2/0	7/1	6/4
<i>C. jeikeium</i>	9 (14.5)	5/3	0/1	0/4	1/0	1/0	1/0	2/0
<i>C. afermentans</i>	5 (8.0)	2/0	0/3	1/0	0/0	1/0	0/0	0/3
<i>C. propinquum</i>	4 (6.4)	0/1	1/2	0/2	0/0	1/0	0/0	0/1
<i>C. argenteorotense</i>	3 (4.8)	1/0	1/1	0/1	0/0	0/0	1/0	1/0
<i>C. minutissimum</i>	2 (3.2)	1/0	0/1	0/0	0/0	0/0	1/0	0/1
<i>C. striatum</i>	1 (1.7)	0/0	0/1	0/0	0/0	0/1	0	0/0
<i>C. urealyticum</i>	1 (1.7)	0/1	0	0/1	0/0	0/0	0	0/0
<i>Corynebacterium</i> sp	4 (6.4)	0/2	0/2	0/0	0/0	0/1	0/1	0/2
<i>Leifsonia aquatica</i> ‡	2 (3.2)	0/0	2/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0
Total (%) 2003-04+2012-13	62 (100%)	28	34	18	4	7	12	21

*.Number of cases per each period of study - 2003-04/2012-13;

CR-BSI, Catheter-related bacteremia - when primary bacteremia occurred after infection of *C. striatum* or tunnel, with a differential time for positivity of blood culture, or with a colony count higher than 15 CFU (after catheter's removal);

CA-BSI, Catheter-associated infection - when the micro-organism of another site of infection did not correspond to the micro-organism isolated from the blood sample obtained from the catheter;

*Solid tumors of both pediatric and adult patients;

**Secondary bacteremia was considered when there was an infectious process in a distant focus and considered as undetermined when there was more than one distant site of infection. It included two peripheral venous access, four silicone and four polyurethane CVC with negative cultures;

‡*Leifsonia aquatica* is a motile micro-organism that is typically found in environmental water habitats and that was classified under the genus *Corynebacterium* for almost 40 years.

Table 3. Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium* sp blood strains isolated from cancer patients with bacteremia during the periods 2003-04 (n=38)/2012-13 (n=24)

Micro-organisms (n=62)	Vancomycin	Linezolid	Amikacin	Ciprofloxacin	Cefepime	Imipenem	Penicillin G	Erythromycin
<i>C. amycolatum</i> (n= 31)	25/6	NT/6	23/4	13/2	20/5	22/6	18/4	15/2
<i>C. jeikeium</i> (n= 9)	5/4	NT/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>C. afermentans</i> (n= 5)	2/3	NT/3	2/3	1/3	1/3	2/3	0/3	0/2
<i>C. propinquum</i> (n= 4)	1/3	NT/3	0/1	0/2	0/3	0/3	0/1	0/1
<i>C. argentoratense</i> (n= 3)	2/1	NT/1	2/0	2/1	2/0	2/1	2/1	2/1
<i>C. minutissimum</i> (n= 2)	1/1	NT/1	1/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
<i>C. urealyticum</i> (n= 1)	0/1	NT/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. striatum</i> (n= 1)	0/1	NT/1	0/1	0/1	0/0	0/1	0/0	0/1
<i>Corynebacterium</i> sp (n= 4)	0/4	NT/4	0/4	0/2	0/4	0/4	0/1	0/3
<i>L. aquatica</i> *(n= 2)	2/0	NT/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	1/0
Total (%)	62 (100)	24 (100)	45 (72.6)	31 (50.0)	42 (67.7)	49 (79.0)	34 (54.8)	30 (48.4)

#,Number of cases per each period of study - 2003-04/2012-13; * Formerly described as *Corynebacterium aquaticum*; NT= not tested 2003-04.

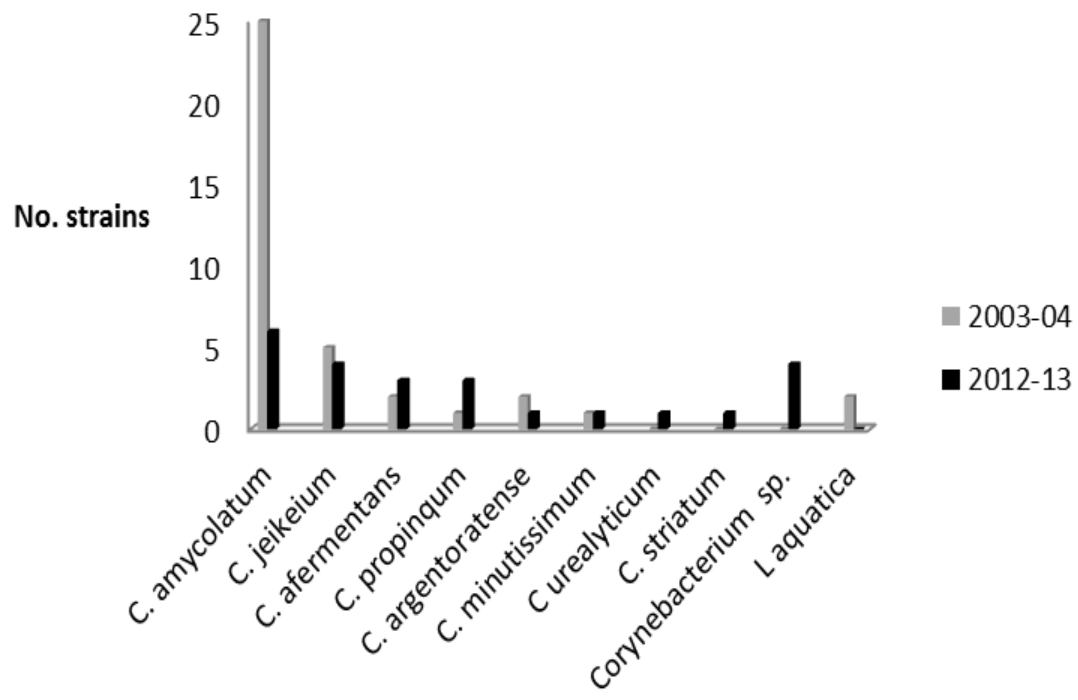


Figure 1: Distribution of non diphtherial Corynebacteria isolated from cancer patients in different periods of investigation: 2003-2004 and 2012

16.3 Artigo 2: Perfil das infecções por amostras toxigênicas e não toxigênicas de *Corynebacterium diphtheriae* em pacientes com câncer no Rio de Janeiro-Brasil, 1996-2013

Dezessete casos de infecções atípicas por *Corynebacterium diphtheriae* foram investigadas em pacientes atendidos no INCA, Rio de Janeiro, Brasil, entre 1996 e 2013 (incidência de 15,8 casos/100.000 admissões). O câncer e outros fatores predisponentes concomitantes foram observados em todas as oportunidades. As doenças de base incluíram tumores sólidos ($n = 14$), o linfoma de Burkitt ($n = 1$) e sem doença maligna em dois casos. A infecção por *C. diphtheriae* ocorreu em 12 pacientes que foram submetidos à cirurgia de cabeça e pescoço, uma cirurgia ginecológica, um cateter de nefrostomia, uma fístula cerebral, uma úlcera de perna e um caso de SIDA. Os sintomas relacionados à produção de toxina diftérica, capaz de atingir o coração, o sistema nervoso central e outros órgãos foram observados em nove casos. Casos de difteria respiratória clássica e endocardites pelo bacilo diftérico não foram encontrados na instituição. *C. diphtheriae* foi isolado em todas as situações em que se observou processo inflamatório agudo. Em exceção a um caso (caso cinco, com cultura pura) *C. diphtheriae* foi isolado em associação com estreptococos ($n = 13$; 40,6%), estafilococos ($n = 10$; 31,3%), bacilos Gram-negativos ($n = 6$; 18,8%) e/ou corineformes ($n = 2$; 6,2%). Entre os pacientes com suspeita de câncer no INCA, a incidência do isolamento de *C. diphtheriae* foi 465 vezes maior do que a encontrada na população do território brasileiro. A propagação de um perfil de PFGE entre as amostras de *C. diphtheriae* isoladas no INCA enfatiza que as infecções atípicas devem ser incluídas entre outras infecções/doenças que o paciente pode adquirir quando recebem cuidados de saúde e/ou durante a internação em uma instituição de saúde (infecções associadas ao atendimento em saúde), especialmente em áreas endêmicas de difteria.

Title page

The spectrum of nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in cancer patients, Rio de Janeiro-Brazil, 1996-2013

Carlos Alberto de Souza Martins^{1,2}, Ricardo Vianna de Carvalho^{1,2}, Lincoln Oliveira Sant'Anna¹, Yuri Vieira Faria¹, Juliana Nunes Ramos^{1,3}, Renata Stavrakakis-Peixoto^{1,4}, Silvana Vargas Superti², Mônica Cristina Souza¹, Louisy Sanches Santos¹, Verônica Viana Vieira³, Raphael Hirata Junior¹, Ana Luíza Mattos-Guaraldi^{1}*

¹ Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro, State University, UERJ, Rio de Janeiro, RJ– LDCIC/FCM/UERJ. The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health- FNS/MS, Brazil;

² Infectious Disease Service, Department of Clinical Microbiology and Hospital Infection Control Committee, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

³ Oswaldo Cruz Institute and National Institute for Quality Control in Health (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPPG/UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, nontoxigenic, malignancy

**Corresponding author at:* Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas. Av 28 de Setembro 87-Fundos 3 andar- Vila Isabel- Disciplina de Microbiologia e Imunologia. CEP 20551-030 - Rio de Janeiro, RJ – Brazil. Tel: (21) 2868-8280. Fax: (21) 2868-8376.
E-mail address: guaraldi@uerj.br.

Abstract

Seventeen cases of atypical *Corynebacterium diphtheriae* infections were recorded in patients treated at a Cancer Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil from 1996 and 2013 (incidence of 15.8 cases/100,000 admissions). Concomitant cancer diseases and/or predisposing factors were found in all opportunities. Underlying diseases included solid tumors ($n=14$), Burkitt's lymphoma ($n=1$) and no malignant disease ($n=2$). The type of infection were 12 head neck surgery, one gynecologic surgery, one catheter of nephrostomy, one brain fistula, one ulcer of leg and one case of Aids. Symptoms of *C. diphtheriae* infection brought about by the diphtheria toxin which can spread to the heart, central nervous system, and other organs were observed in nine opportunities. Cases of classic respiratory diphtheria and endocarditis were not observed in this institution. In all cases with manifestations of acute inflammation the lesion was infected with *C. diphtheriae*. Except in one case of pure culture (Case 5), *C. Diphtheriae* were found in combination with streptococci ($n=13$; 40.6%), staphylococci ($n=10$; 31.3%), Gram-negative bacilli ($n=6$;18.8%) and/or coryneforms ($n=2$; 6.2%). In the population of patients with or suspected of cancer referred to INCA, the incidence was 465 times greater than that found in Brazilian territory. The spread of a PFGE profile in INCA emphasizes that atypical *C. Diphtheriae* infections should be included among other infections/illnesses a patient can catch when receiving healthcare and/or during a stay in a healthcare institution (Healthcare associated infections), especially in diphtheria endemic areas.

Introduction

Corynebacterium diphtheriae represents a global medical challenge, particularly due to the emergence of nontoxigenic strains as the causative agents of pharyngitis and atypical symptoms such as endocarditis, septic arthritis and other forms of systemic disease invasive infections. The difficulty in accurately identifying *C. diphtheriae* is especially significant in view of the several clinical forms which disease can take in addition to the frequency of cases due to nontoxigenic *C. diphtheriae* strains. The number of nontoxigenic *C. diphtheriae* infections might be higher because reporting of only toxigenic *C. diphtheriae* infections is mandatory worldwide (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2009; Clinton *et al.*, 2013; Zazada, 2013).

Diphtheria can result in an acute upper respiratory tract infection characterized by sore throat, fever (often $<38^{\circ}\text{C}$) and an adherent membrane on the tonsils, pharynx and/or nasal cavity (often referred to as a pseudo-membrane). The severity of diphtheria is related to the degree of obstruction of the upper respiratory tract which can cause enlarged anterior cervical lymph nodes and edema of soft tissues giving a "bull neck" appearance, caused by an acute bacterial toxic infection and dissemination of the toxin myocarditis, polyneuritis and other systemic toxic effects. Overall, the case fatality rate may be as high as 20-30% in toxic forms. A milder form of diphtheria may be restricted to cutaneous lesions even when caused by toxin-producing strains. Milder infections resemble streptococcal pharyngitis and the pseudo-membrane may not develop, particularly in vaccinated individuals. The causative bacteria are spread by direct physical contact or breathing aerosolized secretions (Demikhovskaia, 1999).

Although diphtheria causes significant illness and death in developing countries where vaccination coverage is low (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2008; Bitragunta *et al.*, 2008; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001; WHO, 2013), nontoxigenic *C. diphtheriae* strains have been isolated more frequently in developed countries. Infections from nontoxigenic *C. diphtheriae* have been reported in the United States (Wojewoda *et al.*, 2012), Canada (Dewinter *et al.*, 2005; Romney *et al.*, 2006;), Australia (Efstratiou *et al.*, 1993; Kilham & Benn, 1997) and several European countries (von Hunolstein *et al.*, 1990; Patey *et al.*, 1997; Reacher *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2011; Zazada, 2013), during the last decade. In Europe, *Corynebacterium ulcerans* is currently isolated in more frequency from diphtheria cases than *C. diphtheriae* (Wagner *et al.*, 2010). The majority of the cases of diphtheria caused by *C. ulcerans* have occurred in adult patients who had been fully or partially immunized with diphtheria toxoid vaccine (Dewinter *et al.*, 2005).

Nowadays, the increase in difficulties in distinguishing between *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* infection and the microorganism colonization of vaccinated persons reserve the last word in the diagnosis of diphtheria for a clinical physician. This fact emphasizes the necessity of cooperation between a laboratory and clinics for diphtheria diagnosis. Diphtheria could be overlooked at an early stage of the disease or when presenting with atypical features and may cause secondary cases among susceptible people (Demikhovskaia, 1999; Fredlund *et al.*, 2011). The diagnosis of diphtheria is established by a combination of history, physical examination, and positive cultures for *C. diphtheriae*. If the clinical picture is atypical or confusing, PCR testing can provide supporting evidence for the diagnosis, although PCR is not yet an accepted criterion for laboratory confirmation in many countries (Torres *et al.*, 2013).

Different from Poland and Switzerland (Gruner *et al.*, 1994; Zazada & Baczewska-Rej, 2008). *C. diphtheriae* strains isolated and investigated in other countries revealed heterogeneity of biotypes and genotypes, including Brazil (Efstratiou *et al.*, 1993; Mattos-Guaraldi, 1998; Hirata Jr *et al.*, 2008; Clinton *et al.*, 2013; Zazada, 2013).

In Australia, Poland, Italy and the United Kingdom local and/or invasive infections biotype *gravis* dominated among isolates, whereas biotype *mitis* dominated among the invasive isolates in Switzerland, France and Brazil (von Hunolstein *et al.*, 1990; Efstratiou *et al.*, 1993; Kilham & Benn, 1997; Gubler *et al.*, 1998; Hirata Jr *et al.*, 2008; Farfour *et al.*, 2012; Zazada, 2013). Cases of infective endocarditis due to nontoxicogenic atypical sucrose-fermenting *C. diphtheriae* strains were also reported in Brazil (Hirata Jr *et al.*, 2008).

The presence of a single clone among homeless intravenous drug users in Zurich indicated the presence of *C. diphtheriae* in parts of the population with poor standards of hygiene and low socioeconomic status (Gruner *et al.*, 1994; Gubler *et al.*, 1998). The emergence of an invasive clone of nontoxicogenic *C. diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada was also observed (Romney *et al.*, 2006).

Over the past few decades, considerable progress has been made in the treatment of patients with neoplastic diseases. The development of a new array of chemotherapeutic and biologic agents, and the widening use of modalities such as hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), has resulted in a substantial decrease in cancer related death rates. Unfortunately, these treatment options are often associated with profound immunosuppression and an increased risk of infection. The spectrum of infection continues to change and is influenced by various factors including local epidemiology, the use of chemoprophylaxis, and the use of central venous catheters and other medical devices (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001;

Mattos-Guaraldi *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; Nesher & Rolston, 2013). The prompt administration of appropriate, empiric, antimicrobial therapy, prior to the availability of microbiological culture results, is the standard of care. Resistance to antimicrobial agents commonly used for the prevention and treatment of infections in cancer patients has also become a significant problem. Up to date knowledge of the spectrum of infection and local susceptibility/resistance patterns, is critical (Nesher & Rolston, 2013).

The proportion of infections caused by Gram-positive organisms has been reported to be as high as 75-80 % at some cancer treatment centers. Many reports, however, focus attention only on bacteremia caused by a single organism (mono-microbial bacteremia) and either ignore or provide insufficient details regarding infections at other sites and on polymicrobial infections (Zinner, 1999; Martins *et al.*, 2009). Therefore, it is recommended that individual institutions conduct periodic epidemiological surveys in order to have the latest data available for the optimal management of their patients (Nesher & Rolston, 2013).

Corynebacterium species have been increasingly recognized as important pathogens that infect immunocompromised hosts and cause catheter-related bloodstream infections, especially those with linkage with malignancies and human immunodeficiency virus (HIV) infections (Zinner, 1999; Wang *et al.*, 2001; López-Medrano *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2009; Ghidde *et al.*, 2010; Sato & Uchiyama, 2012).

However there are a few reports regarding infections due to potentially toxigenic corynebacteria in immunocompromised patients (Halioua *et al.*, 1992; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Wojewoda *et al.*, 2012).

In the present study, the spectrum of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections and diphtheria in immunocompromised (cancer and AIDS) patients, in National Cancer Institute (INCA) -Rio de Janeiro-Brazil, 1996-2013 was investigated.

Materials and methods

Setting Study -A comparative analysis of the microbiological and clinical profiles and outcomes of cancer patients with *C. diphtheriae* infections from January, 1996 to December, 2013 was conducted in this descriptive serial study. The study protocol was registered and approved by The National Ethic Commission (CONEP) and Institutional Review Committee/Ethic commission, National Cancer Institute (INCA) / Rio de Janeiro – Brazil [CEP number 64/10].

Microbiological data were obtained from the records of the Laboratory of Microbiology at the National Cancer Institute (HC1 – INCA) – RJ, Brazil and from clinical record of each patient, and from the Joint Commission of Infection Control and Surveillance – HC1/INCA.

Data collected for epidemiologic analysis included age, sex, residential area and year of presentation; clinical description including type of infection, anatomic sites, and toxigenic symptoms; underlying disease, predisposing factors, co-morbidities and antimicrobial treatment, outcome (**Tables 1-3**).

Diagnosis of *C. diphtheriae* infection was established if a patient had signs and symptoms of infection and a positive culture (from any clinical site). Antibacterials within 4 weeks of the onset of diphtheria; and concomitant infections or prior infectious within 4 weeks of the onset of diphtheria was assessed. Follow-up period was 4 months for each patient. Breakthrough of *C. diphtheriae* infection was defined as infection occurring in a patient receiving systemic antibacterials with known activity against *C. diphtheriae* for at least 7 days before the onset of disease. Colonization (asymptomatic illness) was defined as a positive culture of *C. diphtheriae* from a nonsterile site, such as the sputum, in the absence of clinical evidence of infection.

C. diphtheriae isolates were sent to Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance - LDCIC/FCM/UERJ, Rio de Janeiro, Brazil for toxigenicity testing, biotyping, susceptibility to antimicrobial agents and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis.

Microbiological analysis - Briefly, two sets of blood samples were obtained from peripheral vein access and from catheter when present, and inoculated into two flasks each of Bactec Plus anaerobic/aerobic, and incubated in a Bactec 9240 System (Becton-Dickinson

Microbiology System, Cockeysville, MD, USA). Positive blood cultures were plated into Columbia blood agar plates (5% defibrinated sheep blood, Difco Laboratories – BD, Detroit-MI) and incubated for 48h/37°C. Bacterial colonies on agar plates of irregular Gram-positive rod (BGPIs) were observed for morphological features of corynebacteria, hemolysis and pigment formation. Phenotypic profiles were determined by using API Coryne System strips (BioMérieux, Lyon, France), and numerical characterization was converted after consultation of apiweb (www.apiweb.biomerieux.com) (**Table 4**). The following conventional biochemical tests were performed by methods previously described (Efstratiou & George, 1999; Funke & Bernard, 2007; Pimenta *et al.*, 2008): Catalase, motility, lipolytic DNase and pyrazinamidase (PYZ) activity, nitrate reduction, urease, fermentation of glucose, maltose, sucrose, manitol, xilose, oxidation and fermentation tests, and CAMP reaction using a beta-lysin-producing *Staphylococcus aureus* strain.

Antimicrobial susceptibility profiles were determined according to the methodologies described previously (Martinez-Martinez *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2008; CLSI, 2011). The sensitivity to 17 antimicrobial agents (Oxoid, Hampshire, UK), showed in **Table 5**, was determined by the disk diffusion method using inoculum equivalent to a 0.5 McFarland standard, according to previously adopted by other authors. Briefly, plates were incubated at 37°C for 24 h and reconfirmed at 48 h using a cation-adjusted Mueller-Hinton agar with 5% sheep blood. Breakpoints for the susceptible strains were used as suggested by the CLSI for bacteria excluded from table 2A to 2K. As there is not yet a defined standard for interpreting these results, the one proposed in the CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7) was used (CLSI, 2007). The breakpoints for *S. aureus* established by CLSI were considered in the cases of penicillin and ampicillin.

In addition to the phenotypic characterization, molecular identification of the isolates was carried out by a multiplex PCR (mPCR) used to provide simultaneous identification and toxigenicity potential of *C. diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* based on primers targeting the following genes: *rpoB* (*Corynebacterium* spp.), 16S rRNA (*C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*), *dtxR* (*C. diphtheriae*) and *tox* gene (diphtheria toxin-DT) (Torres *et al.*, 2013).

DNA fingerprinting by PFGE. Chromosomal DNA preparation were performed as described previously (Garcia-Crespo *et al.*, 2005; Baio *et al.*, 2013). The DNA was cleaved with *Sfi*I (New England BioLabs) according to the manufacturer's instructions. PFGE was carried out in 0.5X TRIS-borate-EDTA-1.2% agarose gels at 13°C with a CHEF DRII system (Bio-Rad).

The pulse times were 3-18 s over 20 h. A lambda DNA concatenated (New England BioLabs) was used as a molecular size marker. PFGE banding profiles were analyzed using the BioNumerics Fingerprinting software (Version 4.0, Applied Math, Belgium). PFGE profiles were identified by letters. The similarity index of the strains was calculated using the Dice correlation coefficient with a band position tolerance of 1% and unweighted-pairgroup method (UPGMA) for clusters analysis was used to construct a dendrogram.

Results

Studying a representative sample of cancer patients aged 4-77 years (mean and median values of 46.8 years and 56 years, respectively) data showed an incidence of 15.8 cases of atypical *C. diphtheriae* infections per 100,000 admissions in INCA, Rio de Janeiro, Brazil from 1996 and 2013. In the population of patients with or suspected of cancer referred to INCA, the incidence of *C. diphtheriae* infections was 465 times greater than that found for diphtheria in Brazilian territory. There were no records of cases of *C. diphtheriae* infection in cancer patients from 2010 to 2013 (**Tables 1 and 2**).

Cases of classic respiratory diphtheria were not observed during this investigation. Patients with clinical features not characteristic of classic diphtheria were discovered to be infected by toxigenic or nontoxigenic strains in the course of diagnostic evaluation for an unrelated or seemingly unrelated process.

Seventeen cases of atypical *C. diphtheriae* infections were recorded in patients treated at INCA: nontoxigenic *C. diphtheriae* strains were isolated from nine patients and toxigenic *C. diphtheriae* were isolated from eight patients. *Corynebacterium ulcerans* was not isolated from immunocompromised patients with cancer or AIDS. Colonization (asymptomatic illness) defined as a positive culture of *C. diphtheriae* isolated from a nonsterile site in the absence of clinical evidence of infection was observed in two opportunities. *C. diphtheriae* was not isolated from blood and other sterile sites.

The locations of the places of residence of cases in the period 1996-2013 are shown in **Table 1**. Patients treated at the Cancer Reference Center were residents of Rio de Janeiro metropolitan area and other cities of three different Brazilian states located at the Eastern and Northeastern regions of the country – Rio de Janeiro, Espirito Santo and Pernambuco. The cities and their neighborhoods are basically inhabited by middle class and lower middle-class population. In Rio de Janeiro metropolitan area, degradation of environmental conditions and low income levels have all hampered efficient health control activities, leading to a deterioration of public services and minimized integrated activity with regard to sanitation, education, communication, and resulting in the emergence and/or endemicity of many infectious diseases, including diphtheria (*apud* Ricardo Lourenço, 2008). Evidence of geographical proximity of places of residence of cases was not found. The spectrum of cases of *C. diphtheriae* infections in INCA during the period 1996-2013 indicate human to human *C. diphtheriae* transmission but not enough to sustain a community outbreak. These findings emphasizes the endemicity of *C. diphtheriae* in Brazilian urban areas.

In INCA, persons most affected were male (70.6%) and with 61–77 years of age (52.54%). *C. diphtheriae* infections among patients <15 years of age with solid tumors were recorded in four opportunities (03 males) (**Tables 1-3**).

Data shown in **Tables 1 and 2** indicate that concomitant cancer diseases and/or predisposing factors were found in all opportunities. Underlying diseases included solid tumors ($n=14$), Burkitt's lymphoma ($n=1$) and no malignant disease ($n=2$; cases 11 and 14).

From 17 *C. diphtheriae* isolates, 13 (76.4%) were isolated from head and neck lesions, 1 (5.9%) from uterine cervix, 1 (5.9%) from CSF fistula, 1 (5.9%) from nephrostomy catheter and 1 (5.9%) were from patients who had stasis ulcer of leg and adenocarcinoma of neck. Predisposing factors included 12 head neck surgery, one gynecologic surgery, one catheter of nephrostomy, one brain fistula, one ulcer of leg and one Aids. Co-morbidities were cardiovascular disease, malnutrition, renal and lung diseases, diabetes mellitus, myxedema and acute anemia (**Table 2**).

In all cases with manifestations of acute inflammation the lesion was infected with *C. diphtheriae*. Signs and symptoms were most observed in the upper respiratory tract (pharyngeal, laryngeal and nasal tissues). Cases of otitis and ocular infection were also observed. Cutaneous infection was observed in five opportunities, including three surgical wound infections, two osteomyelitis of the skull (Cases 6 and 17) and one osteomyelitis of the mastoid (case 12). Invasive infections were diagnosed only in adults: septic arthritis (Case 2), pneumonia (Cases 3, 5 and 13) and two CSF leak. Cases of endocarditis caused by *C. diphtheriae* were not observed in cancer patients during the period of 1996-2013(**Tables 2-5**).

Symptoms of *C. diphtheriae* infection brought about by the diphtheria toxin which can spread to the heart, central nervous system, and other organs were observed in seven opportunities: cervical lymphadenopathy, demyelinating peripheral neuritis and myocarditis. Toxic symptoms were observed in nine cases. Serotherapy was performed in two patients including, a patient (case 9) with classic diphtheria and mucositis due to radiotherapy. Three completely immunized children (4, 8 and 16 years-old) were not submitted to serotherapy.

Except in one case of pure culture, *C. diphtheriae* were found in combination with streptococci ($n=13$; 40.6%), staphylococci ($n=10$; 31.3%), Gram-negative bacilli ($n=6$; 18.8%) and/or coryneforms ($n=2$; 6.2%) (**Tables 2-5**): *Staphylococcus aureus* ($n=10$), *Streptococcus pyogenes* ($n=5$), *Streptococcus agalactiae* ($n=3$), *Streptococcus pneumoniae* ($n=3$), *Streptococcus viridians* ($n=1$), Group G *Streptococci* ($n=1$), *Klebsiella pneumoniae* ($n=1$), *Klebsiella oxytoca* ($n=1$), *Proteus mirabilis* ($n=1$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=3$), *Corynebacterium minutissimum* ($n=1$), *Arcanobacterium haemolyticum* ($n=1$).

Atypical *C. diphtheriae* infections were caused by both sucrose fermenting and non-fermenting biotypes (**Table 4**). The infections in cancer patients were caused mostly by *C. diphtheriae* subsp. *mitis*, although *C. diphtheriae* subsp. *gravis* and *belfanti* were also found associated with atypical infection in immunocompromised cancer patients. *C. diphtheriae* subsp. *belfanti* was isolated from one of the three patients presenting pneumonia (**Tables 2 and 4**).

Antimicrobial therapy dispensed for each case is displayed in **Table 3**, and antimicrobial susceptibility profiles are shown in **Table 6**. Microorganisms tested showed reduced susceptibilities to Oxacillin (88.2%), Ceftazidime (86.7%), Ampicillin (12.5%), Ciprofloxacin (6.7%) and Penicillin G (6.2%). In five fatal cases, including two patients that did not respond to antimicrobial therapy (cases 2 and 3) were treated with cefazolin, oxacillin, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, clarithromycin, and/or erythromycin.

In the present study, we observed heterogeneity with regard to *C. diphtheriae* isolates in the period to 1996-2013 (**Figure 1**). PFGE analysis showed the presence of 14 restriction profiles (A –N) among 16 isolates from Cancer National Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil indicating a broad genetic diversity. The 371 and 814 isolates, from different patients, were classified as belonging to the same PFGE profile. They were isolated from single patient (case 9). PFGE analysis also showed the presence of two different PFGE profiles (PFGE profiles A and D) at same patient (Case 5). Interestingly, PFGE profile A was found in two strains isolated from different patients hospitalized in 1996 and 2000 (cases 1 and 5), suggesting the spread of these PFGE profile in this hospital (**Tables 3 and 4**).

Discussion

The dramatic decrease in the incidence of diphtheria following the introduction of the vaccine has highlighted the emergence of localized and invasive atypical disease (Clinton *et al.*, 2013). Invasive diseases add new aspects to the infectious processes caused by nontoxigenic *C. diphtheriae* and identify this species as an emerging pathogen (Hirata *et al.*, 2008). There are several reports suggesting that the transmission of nontoxigenic *C. diphtheriae* may be augmented by unsanitary conditions where individuals are in close proximity to one another (Clinton *et al.*, 2013).

Different from data recently observed by Zazada (Zazada, 2013) in Poland, that showed only 17% of cases of nontoxigenic *C. diphtheriae* infections with concomitant diseases or predisposing factors, in the present study, epidemiologic data analysis revealed that predisposing factors of *C. diphtheriae* infections were related to history of an immunocompromised state in addition to conditions associated with low socioeconomic status.

A recent case report of *C. diphtheriae* sepsis in an immunocompromised host also suggests that a fragile immune system may facilitate invasive disease (Wojewoda *et al.*, 2012). Since all the patients described here had a history of an immunocompromised state, another possibility is that the patients were asymptomatic carriers who were partially immunized and infected with *C. diphtheriae* strains until conditions were ideal for the organism to proliferate and cause disease.

C. diphtheriae was also formerly found infecting unusual anatomic sites such as ears, conjunctiva, semen and vagina (*apud* Mattos-Guaraldi *et al.*, 2003). A case of cutaneous diphtheria in a HIV patient was also reported (Halioula *et al.*, 1992). Recently, a case of sexually transmitted diphtheria in a patient with non-gonococcal urethritis after orogenital contact was reported (Berger *et al.*, 2013). In this study, *C. diphtheriae* was also found infecting ears, conjunctiva and vagina of cancer patients. The pathogen also was also isolated from ulceration on the nares of a HIV patient suspect of invasive cervical carcinoma.

Taking the literature review into consideration, nontoxigenic *C. diphtheriae* infections frequently were associated with endocarditis (Holfelder *et al.*, 2004; Hirata Jr *et al.*, 2008; Clinton *et al.*, 2013; Zazada, 2013). This finding, however, was not currently observed among cancer patients.

No atypical *C. diphtheriae* infections among children were recorded in Poland, whereas in France, almost 20% of invasive infections were diagnosed in children. In Italy and the United Kingdom, 70% and 13% of isolates, respectively, originated from patients <15

years of age (Reacher *et al.*, 2000; von Hunolstein *et al.*, 2003; Farfour *et al.*, 2012). In Brazil, atypical *C. diphtheriae* infections were observed among both children <15 years of age and adults treated at INCA.

Bacteriological analysis of the cases of non-toxigenic or toxigenic *C. diphtheriae* infections also showed the presence of *S. aureus*, *S. pyogenes* and *S. agalactiae* among other pathogens. Data suggest that these other bacterial species may well contribute to the clinical picture and the success of antimicrobial therapy (Gomes *et al.*, 2009).

The increasing problems with multidrug resistance in *C. diphtheriae* is an example of the challenge confronting tropical countries. In Brazil, previous studies showed most *C. diphtheriae* strains (95.74%) with resistance to mupirocin, aztreonam, ceftazidime, and/or oxacillin, ampicillin, tetracycline, clindamycin, lincomycin and erythromycin. In that opportunity, 14.8% strains tested showed MIC < 0.002-0.38 µg/ml to penicillin G (Pereira *et al.*, 2008). Conversely, microorganisms isolated from cancer patients were all susceptible to most of the antimicrobial agents tested, including vancomycin and erythromycin. Only one strain showed decreased susceptibility to penicillin G.

Biochemical discrimination of *C. diphtheriae* has traditionally been used to distinguish strains in the clinic, although its basis in genomics remains unclear (Sangal *et al.*, 2014). In countries reporting nontoxigenic *C. diphtheriae* infections, biotype *gravis* dominated among isolates from local infections in Italy and the United Kingdom whereas biotype *mitis* dominated among the invasive isolates in Switzerland and France. Only in Poland, all strains isolated from local and invasive infections belonged to a single clone of biotype *gravis* in different part of the country over a 9-year period (Reacher *et al.*, 2000; von Hunolstein *et al.*, 2003; Farfour *et al.*, 2012). Herein, *C. diphtheriae* isolates from local and invasive infections in cancer patients were identified as biotypes *mitis*, *gravis* or *belfanti*.

Previously published studies indicated the involvement of atypical sucrose fermenting *C. diphtheriae* strains in cases of diphtheria and endocarditis (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1998; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2003; Hirata Jr, 2011). Although in this study, cases of classic diphtheria and endocarditis were not observed in cancer patients, we documented the involvement of sucrose fermenting *C. diphtheriae* strains of varied PFGE profiles not only in cases of skin lesions and pneumonia (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001) but also in cases of osteomyelitis, surgical skin lesion, conjunctivitis and sinusitis in cancer patients.

However, the traditional phenotypic characterization of *C. diphtheriae* isolates is not suitable for epidemiological and evolutionary studies. Difference in the gene content and

putative loss or gain of function does not always correspond reliably with biovar designations and adoption of MLST and whole genome sequencing are much more reliable methods for characterizing *C. diphtheriae* (Trost *et al.* 2012; Viguetti *et al.*, 2012; Sangalet *et al.*, 2014).

Genotyping diphtheria strains not only allows differentiation of endemic, epidemic, and imported strains but also helps monitor its adaptability, virulence, and pathogenicity, thus ensuring adequacy of protection through existing vaccines (Popovic *et al.*, 2000). During the last decades, the identification of bacterial strains based in phenotypic characteristics has been replaced by genotypic approaches through molecular biology techniques, being the PFGE one of the most adopted and accepted (Tenover *et al.*, 1995; Miragaia *et al.*, 2002). According to some authors, bacteria involved in an outbreak and/or an epidemic should present indistinguishable patterns when analyzed through PFGE, whereas those not involved in an epidemic should present distinct patterns (Tenover *et al.*, 1995; Miragaia *et al.*, 2002).

In Europe, *Corynebacterium ulcerans* is currently isolated in more frequency from diphtheria cases than *C. diphtheriae* (Wagner *et al.*, 2010). The majority of the cases of diphtheria caused by *C. ulcerans* have occurred in adult patients who had been fully or partially immunized with diphtheria toxoid vaccine (Dewinter *et al.*, 2005). Although *C. ulcerans* was also found in human with pulmonary infection in Rio de Janeiro, metropolitan area, Brazil (Mattos-Guaraldiet *al.*, 2008), localized or invasive infections due to this zoonotic pathogen had not occurred in cancer patients.

In conclusion, a high incidence of cases of atypical *C. diphtheriae* infections were recorded in patients treated at a Cancer Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil from 1996 to 2013. Data emphasized that nontoxigenic *C. diphtheriae* cause different nosocomial infections of immunocompromised patients belonging to unsecured strata of the society. Invasive infections such as osteomyelitis, septic arthritis and pneumonia were found in adults while cutaneous lesions including surgery and catheter insertion sites were observed in adults and/or children. Concomitant cancer diseases and/or predisposing factors were found in all opportunities. Although *C. ulcerans* was also found in human with pulmonary infection in Rio de Janeiro, metropolitan area, Brazil (Mattos-Guaraldiet *al.*, 2008), localized or invasive infections due to this zoonotic pathogen had not occurred in cancer patients. PFGE analysis indicated a broad genetic diversity of *C. diphtheriae* strains capable of causing atypical infections in immunocompromised hosts, such as cancer and HIV patients. The spread of a PFGE profile in INCA - Rio de Janeiro, emphasizes that *C. Diphtheriae* infections should be included among other infections/illnesses a patient can catch when receiving healthcare and/or

during a stay in a healthcare institution (Healthcare associated infections), especially in metropolitan areas of developing countries where diphtheria remains endemic.

Conflicts of interest

The authors declare there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Financial support of CAPES, FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ, INCA-RJ e Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD (CAPES/MEC) e PAPD (FAPERJ/CAPES).

References

1. Baio PV, Mota HF, Freitas AD *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108: 23-29.
2. Berger A, Lensing C, Konrad R, Huber I, Hogardt M, Sing A. Sexually transmitted diphtheria. *Sex Transm Infect* 2013; 89: 100-101.
3. Bitragunta S, Murhekar MV, Hutin YJ, Penumur PP, Gupte MD. Persistence of diphtheria, Hyderabad, India, 2003-2006. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1144-1146.
4. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline. CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7): 4-6; 2007.
5. Clinton LK, Bankowski MJ, Shimasaki T *et al.* Culture-negative prosthetic valve endocarditis with concomitant septicemia due to a nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype *gravis* isolate in a patient with multiple risk factors. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3900-3902.
6. Demikhovskaia EV. Diphtheroids and nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the etiology of diphtheria. *Mikrobiol Z* 1999; 61: 81-89.
7. Dewinter LM, Bernard KA, Romney MG. Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3447-3449.
8. Edwards B, Hunt AC, Hoskisson PA. Recent cases of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Scotland: justification for continued surveillance. *J. Med. Microbiol* 2011; 60: 561-562.
9. Efstratiou A, George RC. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. *Commun Dis Public Health* 1999; 2: 250-257.
10. Efstratiou A, Tiley SM, Sangrador A *et al.* Invasive disease caused by multiple clones of *Corynebacterium diphtheriae* [letter]. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 136.
11. Farfour E, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, *et al.* Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 173-175.
12. Fredlund H, Norén T, Lepp T, Morfeldt E, Henriques Normark B. A case of diphtheria in Sweden, October 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: pii=20038. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/viewarticle.aspx?articleid=20038>.
13. García-Crespo D, Navas J, Gradillas G, Juste RA. Technical note: molecular typing of *Corynebacterium bovis* isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Dairy Sci* 2005; 88: 1705-1707.
14. Ghidde S, Jiang Y, Hachem R, Chaftari AM, Raad I. Catheter-related *Corynebacterium* bacteremia: should the catheter be removed and vancomycin administered? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 153-156.
15. Gomes DL, Martins CA, Faria LM, Santos LS, *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1419-1427.

16. Gruner E, Opravil M, Altwegg M, von Graevenitz A. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from intravenous drug users. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 94-96.
17. Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. An outbreak of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1295-1298.
18. Halioua B, Patey O, Casciani D, *et al.* Cutaneous diphtheria in a patient with HIV infection. *Ann DermatolVenereol* 1992; 18: 874-877.
19. Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, *et al.* Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 986-991.
20. Hirata R Jr, Pacheco LG, Soares SC, *et al.* Similarity of *rpoB* gene sequences of sucrose-fermenting and non-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; 99: 733-737.
21. Holfelder M, Bock-Hensley O, Lisson C, Funke G. Case report: fatal course of endocarditis following an infection with nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype *var mitis*. *Euro Surveill* 2004; 8: 2397.
22. Kilham H, Benn R. Editorial: Diphtheria - the Australian perspective. *Comm Dis Intell* 1997; 12: 164-165.
23. López-Medrano F, García-Bravo M, Morales JM, *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. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 825-830.
24. Lourenço-de-Oliveira R. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008 – editorial. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 627-628.
25. Martínez-Martínez L, Ortega MC, Suárez AL. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1318-1321.
26. Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr Microbiol* 1998; 37: 156-158.
27. Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Camello TCF, Pereira GA, Hirata R Jr, Halpern M. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 96-100.
28. Mattos-Guaraldi AL, Sampaio JLM, Santos CS, *et al.* First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 396-400.
29. Mattos-Guaraldi AL, Damasco PV, Gomes DL, *et al.* Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1685-1688.
30. Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Júnior R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world--an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 987-993.

31. Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, *et al.* Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five years study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 905-913.
32. Miragaia M, Couto I, Pereira SF, *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence geographic dissemination. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 430-438.
33. Neshler L, Rolston KV. The current spectrum of infection in cancer patients with chemotherapy related neutropenia. *Infection* 2013; DOI 10.1007/s15010-013-0525-9.
34. Patey O, Bimet F, Riegel P *et al.* Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. Coryne Study Group. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 441-445.
35. Pereira A, Pimenta FP, Santos FRW, *et al.* Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 507-510.
36. Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, *et al.* DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46: 307-311.
37. Popovic T, Mazurova IK, Efstratiou A, *et al.* *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 1: S168-177. Review.
38. Reacher M, Ramsay M, White J *et al.* Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*: an emerging pathogen in England and Wales? *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 640-645.
39. Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1625-1629.
40. Sangal V, Burkovski A, Hunt A, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. *Infect Genet Evol* 2013; 2: 54-57.
41. Sato K, Uchiyama M. *Corynebacterium jeikeium* bacteraemia and pulmonary infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. *BMJ Case Rep* 2012; 20; 2012.
42. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.
43. Torres LFC, Ribeiro D, Hirata Jr R, *et al.* Multiplex PCR for identification and toxigenicity of *Corynebacterium* group of zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108: 272-279.
44. Trost E, Blom J, Soares SC, *et al.* Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *J Bacteriol* 2012; 194: 3199-3215.
45. Viguetti SZ, Pacheco LG, Santos LS *et al.* Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. *Epidemiol Infect* 2012; 140: 617-620.
46. von Hunolstein C, Alfarone G, Scopetti F, *et al.* Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. *J Med Microbiol* 2003; 52: 181-188.
47. Wagner KS, White JM, Neal S, *et al.* Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 1519-1530.

48. Wang CC, Mattson D, Wald A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. *BoneMarrowTransplant* 2001; 27: 445-449.
49. WHO. Diphtheria reported cases 2013; http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidencediphtheria.html. Last update: 20-Oct-2013. Data as of 16-Oct-2013.
50. Wojewoda CM, Koval CE, Wilson DA, Chakos MH, Harrington SM. Bloodstream infection caused by nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an immunocompromised host in the United States. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2170-2172.
51. Zasada AA. Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae*, Poland, 2004-2012. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1870-1872.
52. Zasada AA, Baczewska-Rej M. Types of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Poland in 2004-2008. *Med Dosw Mikrobiol* 2008; 60: 183-190.
53. Zinner SH. Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: emphasis on gram-positive and resistant bacteria. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 490-494.

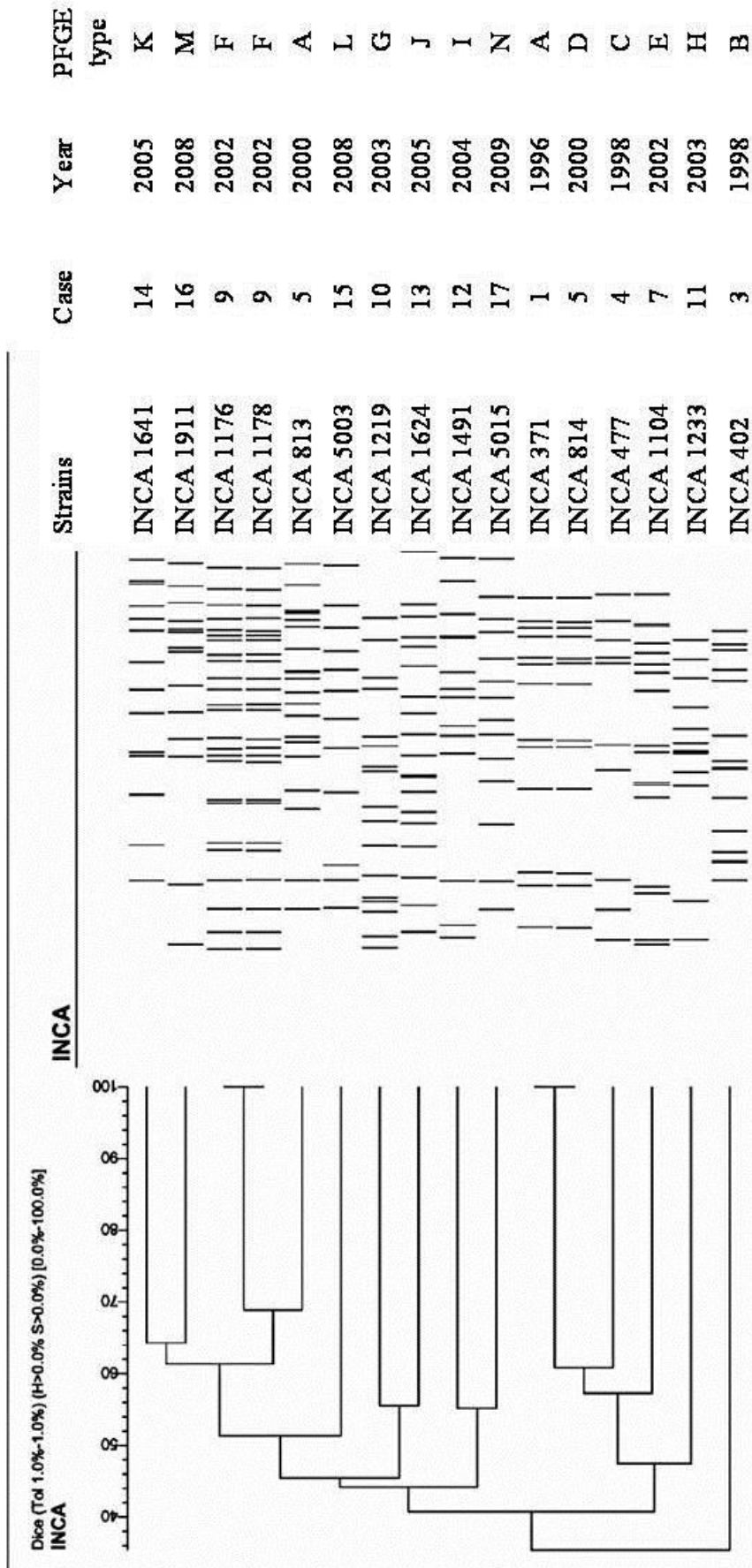


Figure 1. PFGE analysis of *Corynebacterium diphtheriae* isolates in the period to 1996-2013 showed the presence of 14 restriction profiles (A -N) among 16 isolates from Cancer National Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. PFGE profile A was found in two strains isolated from different patients hospitalized in 1996 and 2000 (cases 1 and 5), suggesting the spread of these PFGE profile among cancer patients from this hospital. Note: case 2, 6 and 8 not available.

Table 1. Demographic and clinical aspects of patients admitted to National Cancer Institute –INCA, Rio de Janeiro/RJ-Brazil and further diagnosed with *Corynebacterium diphtheriae* infections (1996-2013)

Case/ <i>C. diphtheriae</i> Strs	Hospitalization Date	Residential Metropolitan areas and cities/State*	Age(y) /sex	Underlying Disease	Site/type of <i>C. diphtheriae</i> infection	Mort ality on the 30 th day
1 /INCA 371	Nov/1996	Vila Velha/ES	45/M	Basal cell carcinoma of face	Face/Surgical wound infection	No
2 /UD	Jun/1997	Magalhães Bastos, Rio de Janeiro/RJ	62/F	Uterine cervix carcinoma	Gynecological tract/Surgical wound infection, septic arthritis	Yes
3 /INCA 402	Ap/1998	Senador Camará, Rio de Janeiro/RJ	75/F	Pleomorphic adenoma of nasopharynx	Lung/Pneumonia	Yes
4 /INCA 477	Jun/1998	Barra da Tijuca, Rio de Janeiro/RJ	14/F	Condroid cordoma of nasopharynx	Nasopharynx/Surgical wound infection	No
5 /INCA 813/14	Jul/2000	Campo Grande Rio de Janeiro/RJ	71/M	Squamous cell carcinoma of larynx	Lung/Pneumonia	No
6 /INCA 815	Jul/2000	Saquarema/RJ	60/M	Basal cell carcinoma of scalp	Skull/Osteomyelitis	No
7 /INCA 1104	Ap/2002	Madureira Rio de Janeiro/RJ	16/M	Juvenile Angiofibroma of nasopharynx	Sphenopalatine sinus/CSF leak	No
8 /INCA 1139	Aug/2002	Magé/RJ	77/M	Adenocarcinoma of piriform sinus	Leg/Chronic venous ulcer	Yes
9 /INCA 1176/78	Nov/2002	Campos/RJ	14/M	Burkitt's lymphoma	Brain/CSF leak	No
10 /INCA 1219	Mar/2003	Casemiro de Abreu/RJ	74/M	Cystic epidermoid carcinoma of nasal septum	Face/Radionecrosis	No
#11 /INCA 1233	Ap/2003	Santa Cruz, Rio de Janeiro/RJ	32/F	Aids	Nasopharinx/Chronic granulomatous ulcer	No
12 /INCA 1491	Jul/2004	Duque de Caxias/RJ	4/M	Mucoepidermoid carcinoma of parotid	Ear/Otitis, mastoiditis, celulitis	No
13 /INCA 1624	Jun/2005	Nova Iguaçu/RJ	56/M	Squamous cell carcinoma of larynx	Lung/Pneumonia	No
#14 /INCA 1641	Sept/2005	Duque de Caxias/RJ	73/M	Inflammatory tumour of nasopharynx	Nasopharynx/Inflammatory tumour	No
15 /INCA 5003	Mar/2008	Rio de Janeiro/RJ	73/M	Bladder carcinoma	Nephrostomy/Catheter insertion site	No
16 /INCA 1911	Jul/2008	Olinda/Pe	8/M	Bone aneurysmatic cyst of nasopharynx	Nasopharynx/Recurrent purulent rhinitis	No
17 //INCA 5015	Jan/2009	Rio Comprido, Rio de Janeiro/RJ	41/F	Cystic adenoid carcinoma of nasal septum	Skull/Radionecrosis and osteomyelitis of frontal bone	No

#, Patients transferred to other hospitals; *, Basically middle class and lower middle-class population; RJ, Estate of Rio de Janeiro ES, State of Espírito Santo; Pe, State of Pernambuco; M, Male; F, Female; y, year; m, month; d, day UD, Unknown data.

Table 2. Demographic characteristics of 17 cases of *Corynebacterium diphtheriae* infections - National Cancer Institute –INCA, Rio de Janeiro/RJ- Brazil, 1996-2013

Characteristics	Values
Age, years (mean)	46.8 years (4-77)
(median)	56 years
Sex (male)	12 (70.6%)
Underlying disease	# (%)
Adult solid tumour	10 (58.8)
Paediatric solid tumour	4 (23.5)
Non-Hodgkin Lymphoma	1 (5.9)
AIDS	1 (5.9)
Cervical lymphadenopathy*	1 (5.9)
Predisposing factors	
Medical Procedures	
Surgery	12 (70.6)
Radiotherapy	8 (47.1)
Tracheostomy	4 (23.5)
Chemotherapy	1 (5.9)
Comorbidities	
Cardiovascular disease	7 (41.2)
Malnutrition	5 (29.4)
Renal disease	4 (23.5)
Lung disease	3 (17.6)
Diabetes mellitus	2 (11.8)
Myxedema	1 (5.9)
Acute anemia	1 (5.9)
Interpretation of bacterial cultures	# (%)
Non toxigenic infections	8 (47.1)
Atypical diphtheria cases*	17(100.0)

*Patients with clinical features not characteristic of classic diphtheria were discovered to be infected by toxigenic strains in the course of diagnostic evaluation for an unrelated or seemingly unrelated process.

Table 3. Correlation of PFGE pulsotypes of *Corynebacterium diphtheriae* strains with clinical-epidemiological features of hospitalized patients - National Cancer Institute - INCA, Rio de Janeiro/RJ-Brazil, 1996-2013

Case/ <i>C. diphtheriae</i> strain	Date	Residential		Age(y)/ sex	Type and site of <i>C. diphtheriae</i> infection		Toxic symptoms	Post diagnosis treatment		Outcome	PFGE type
		Metropolitan area and city/State			SAD	Antibiotictherapy					
1/INCA 371	Nov/1996	Vila Velha/ES		45/M	Surgical wound infection	Face	No	No	Cephalexin	Alive	A
2/UD	Jun/1997	Magalhães Bastos, Rio de Janeiro/RJ		62/F	Surgical wound infection; septic arthritis	Gynecological tract	Yes	No	Cefazolin, oxacillin**	Death 8/7/97	-
3/INCA 402	Ap/1998	Senador Camará, Rio de Janeiro/RJ		75/F	Pneumonia	Lung	Yes	No	Ceftazidime, metronidazole	Death 21/4/98	B
4/INCA 477	Jun/1998	Barra da Tijuca, Rio de Janeiro/RJ		14/F	Surgical wound infection	Nasopharynx	No	No	Ceftazidime, oxacillin, penicillin G	Death 23/12/98	C
5/INCA 813/14	Jul/2000	Campo Grande Rio de Janeiro/RJ		71/M	Pneumonia	Lung	Yes	No	Ceftriaxone, erythromycin**	Death 16/9/00	D,A
6/INCA 815	Jul/2000	Saquarema/RJ		60/M	Osteomyelitis	Skull	No	No	Cefazolin, Cefazolin, trimethoprim/sulfamethoxazole , erythromycin.,	Death 3/5/01	-
7/INCA 1104	Ap/2002	Madureira Rio de Janeiro/RJ		16/M	CSF leak	Sphenoplatine sinus	No	Vacina		Alive	E
8/INCA 1139	Aug/2002	Magé/RJ		77/M	Chronic venous ulcer	Leg	No	No	Erythromycin	Death 12/9/02	-
9/INCA 1176/78	Nov/2002	Campos/RJ		14/M	CSF leak	Brain	Yes	Yes	Penicillin G	Alive	F,F
10/INCA 1219	Mar/2003	Casemiro de Abreu/RJ		74/M	Radiation necrosis	Face	No	No	Clarithromycin	Alive	G
#11/INCA 1233	Ap/2003	Santa Cruz, Rio de Janeiro/RJ		32/F	Chronic granulomatous ulcer	Nasopharynx	Yes	Yes	Amoxicillin-clavulanate**	Alive	H
12/INCA 1491	Jul/2004	Duque de Caxias/RJ		4/M	Otitis/mastoiditis / cellulitis	Ear	Yes	Vacina	Ceftriaxone, clarithromycin**	Alive	I
13/INCA 1624	Jun/2005	Nova Iguaçu/RJ		56/M	Pneumonia	Lung	Yes	No	Cefepime/clarithromycin	Death 15/8/05	J
#14/INCA 1641	Sept/2005	Duque de Caxias/RJ		73/M	Inflammatory tumor	Nasopharynx	Yes	No	Clarithromycin	Alive	K
15/INCA 5003	Mar/2008	Rio de Janeiro/RJ		73/M	Catheter insertion site	Nephrostomy	Yes	No	Imipenem/Meropenem, ampicillin	Death 5/9/08	L
16/INCA 1911	Jul/2008	Olinda/Pe		8/M	Recurrent purulent rhinitis	Nasopharynx	No	Vacina	Amoxicillin-clavulanate, clarithromycin	Alive	M
17/INCA 5015	Jan/2009	Rio Comprido, Rio de Janeiro/RJ		41/F	Radiation necrosis and osteomyelitis of frontal bone	Skull	No	No	Amoxicillin-clavulanate	Death 10/6/10	N

#, Patients transferred to other hospitals; *, Basically middle class and lower middle-class population; RJ, Estate of Rio de Janeiro; ES, State of Espírito Santo; Pe, State of Pernambuco; M, Male; F, Female; Y, year; M, month; D, day; UD; Unknown data. ** Breakthrough to systemic antimicrobial empirical treatment.

Table 4. Microbiological properties of cases of *Corynebacterium diphtheriae* infections - National Cancer Institute -INCA, Rio de Janeiro/RJ- Brazil, 1996-2013

Case/ <i>C. diphtheriae</i> strain/year	Site/ Type of infection	Toxic symptoms	Co-infection	API code	Biotype	Elek and/or PCR (<i>tox</i> gene)	PFGE type
1/INCA 371/1996	Face/Surgical wound infection	No/tumor infection	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	1010325	S+/mitis	Negative	A
2/-/1997	Gynecological tract/Surgical wound infection, septic arthritis	Toxemia/Miocarditis,neuritis	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i>	UD	UD/gravis	UD	-
3/INCA 402/1998	Lung/Pneumonia	Toxemia/Miocarditis	<i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0010325	S+/bel/fanti	Positive	B
4/INCA 477/1998	Nasopharynx/Surgical wound infection	No/Tumor infection	<i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium minutissimum</i>	1010327	S-/gravis	Negative	C
5/INCA 813-14/2000	Lung/Pneumonia	Toxemia/Pseudomembrane of the larynx	Pure culture	1010324- 1010324	S-/mitis	Positive	D,A
6/INCA 815/2000	Skull/Osteomyelitis	No/Tumor infection	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>P. aeruginosa</i> ,	1010325	S+/mitis	Negative	-
7/INCA 1104/2002	Sphenopalatine sinus/CSF leak	No/Purulent rhinitis chronic relapsing	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1010305**	S+/mitis	Negative	E
8/INCA 1139/2002	Leg/Chronic venous ulcer	No/Skin infection	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1010325	S+/mitis	Negative	-
9/INCA 1176-78/2002	Brain/CSF leak	Toxemia/Miocarditis, bull neck, paralysis of the soft palate and pairs of cranial nerves	<i>S. aureus</i> , Group G <i>Streptococci</i>	1010325- 1010325	S+/mitis	Positive	F,F
10/INCA 1219/2003	Face/Radiation necrosis	No/Ulcerative necrosis	<i>S. aureus</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	1010325	S+/mitis	Negative	G
#11/INCA 1233/2003	Nasopharynx/Chronic granulomatous ulcer	Toxemia/Paralysis of the soft palate, miocarditis and neuritis	<i>Streptococcus viridans</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	1010304**	S+/mitis	Positive	H
12/INCA 1491/2004	Ear/Otitis, mastoiditis, cellulitis, conjunctivitis	Toxemia/Odynophagia, disseminated intravascular coagulation	<i>S. pyogenes</i>	10103304**	S+/mitis	Positive	I
13/INCA 1624/2005	Lung/Pneumonia	Toxemia/Miocarditis	<i>S. pneumoniae</i>	10103304**	S+/mitis	Positive	J
#14 INCA 1641/2005	Nasopharynx/Inflamatory tumour	Toxemia/Miocarditis, Paralysis of the soft palate	<i>S. agalactiae</i>	10103304**	S+/mitis	Positive	K
15/INCA 5003/2008	Nephrostomy/Catheter insertion site	Toxemia/Miocarditis	<i>S. agalactiae</i>	1010324	S-/mitis	Positive	L
16/INCA 1911/2008	Nasopharynx/Recurrent purulent rhinitis	No/Purulent rhinitis chronic relapsing	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i>	1010324	S-/mitis	Negative	M
17//INCA 5015/2009	Skull/Radiation necrosis and osteomyelitis of frontal bone	No/ Bone infection	<i>S. aureus</i>	1010324	S-/mitis	Negative	N

#, Patients transferred to other hospitals; *, Basically middle class and lower middle-class population; RJ, Estate of Rio de Janeiro ES, State of Espírito Santo; Pe, State of Pernambuco; M, Male; F, Female; y, year; m, month; d, day; UD, Unknown data. S, Sucrose fermentation. **, maltose and sucrose -positive - conventional biochemical tests.

Table 5. Characteristics of infection and number of strains of diphtheria bacilli isolated from cancer patients - National Cancer Institute –INCA, Rio de Janeiro/RJ-Brazil, 1996-2013

	Value (%)
Classic respiratory diphtheria	0
Carriage state	2
<i>C. diphtheriae</i> atypical infection	15
Toxigenic <i>C. diphtheriae</i>	9
Non-toxigenic <i>C. diphtheriae</i>	8
<i>C. ulcerans</i>	0
<hr/>	
<i>C. diphtheriae</i> biotypes	
<i>gravis</i>	2
<i>mitis</i>	14
<i>belfanti</i>	1
Sucrose-positive	11
Sucrose-negative	5
Sucrose-indetermined	1
<hr/>	
Signs and symptoms	
Pseudomembrane formation	1
Nasal	2
Nasopharyngeal	6
Laryngeal	2
Broncopneumonia	3
CSF leak	2
Septic arthritis	1
Osteomyelitis	3
Endocarditis	0
Skin lesions	5
Surgical wound infection	3
Otitis	1
Ocular infection	1
Cervical lymphadenopathy	3
Demyelinating peripheral neuritis	4
Myocarditis	7
<hr/>	
Co-infection	
<i>Streptococcus sp</i>	13 (40.6)
<i>S. aureus</i>	10 (31.3)
<i>P. aeruginosa</i>	3 (9.4)
Non-fermentative bacilli	3 (9.4)
Gram-positive bacilli	2 (6.2)
None	1 (3.1)

Table 6.Antimicrobial susceptibility profiles of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from patients with nontoxigenic *C. diphtheriae* infections and diphtheria -National Cancer Institute–INCA, Rio de Janeiro/RJ-Brazil, 1996-2013

Antimicrobial agents	Number of <i>C. diphtheriae</i> strains		
	Total	Susceptible	Resistant
Vancomycin	17	17 (100)	0
Amikacin	10	10 (100)	0
Tobramycin	11	11 (100)	0
Cefazolin	16	16 (100)	0
Ceftriaxone	16	16 (100)	0
Ceftazidime	15	2 (13.3)	13 (86.7)
Cefepime	16	16 (100)	0
Imipenem	16	16 (100)	0
Penicillin G	16	15 (93.8)	1 (6.2)
Ampicillin	16	14 (87.5)	2 (12.5)
Oxacillin	17	2 (11.8)	15 (88.2)
Ciprofloxacin	15	14 (93.3)	1 (6.7)
Ofloxacin	10	10 (100)	0
Erythromycin	12	12(100)	0
Chloramphenicol	12	12(100)	0
Gentamicin	6	6(100)	0
Norfloxacin	9	9 (100)	0

Antimicrobial susceptibility breakpoints were determined by the disk diffusion method (CLSI, 2007).

16.4 Artigo 4: *Corynebacterium diphtheriae* como um patógeno emergente em infecção relacionada a cateter de nefrostomia: análise de propriedades associadas à virulência bacteriana.

Corynebacterium diphtheriae ainda representa um desafio global em medicina, particularmente devido ao número significativo de indivíduos suscetíveis à difteria e o surgimento de cepas não toxigênicas como os agentes causadores de infecções invasivas. No presente estudo, foram descritas as características clínicas e microbiológicas do primeiro caso descrito de infecção por *C. diphtheriae* na inserção do cateter de nefrostomia percutânea em paciente idoso com câncer fatal de bexiga. Em adição, demonstramos o papel potencial da adesão, formação de biofilme e da deposição de fibrina na amostra de *C. diphtheriae* da infecção relacionada ao cateter de nefrostomia. *C. diphtheriae* não-toxigênico, isolado da secreção purulenta (nomeado BR-CAT5003748) foi identificado através do sistema de galeria API Coryne System (código 1 010 324) e pelo PCR multiplex para detecção de genes *dtxR* e *tox*. A cepa BR-CAT5003748 apresentou resistência à oxacilina, ceftazidima e ciprofloxacina. Os experimentos realizados *in vitro* mostraram que a cepa isolada de cateter exibiu aderência moderada ao poliestireno e foi classificada como moderadamente hidrofóbica. O vidro apresentou uma superfície mais eficaz para a formação de biofilmes que o poliestireno. Microrganismos aderiram ($>1,5 \times 10^6$ u.f.c.) e multiplicaram nas superfícies de cateteres de poliuretano. A formação de microcolônias (uma característica da formação de biofilme) e a deposição de materiais amorfos, foram observados nas superfícies do lumen e externa do cateter através de microscopia eletrônica de varredura. Os microrganismos aderiram com a expressão simultânea de padrões de aderência localizada e agregativa (LAL/AAL) em células HEp-2. Curiosamente, o tubo de ensaio com o teste da coagulase em plasma de coelho mostrou a formação de uma fina camada de fibrina após a reação com a estirpe toxigênica BR-CAT5003748. Em conclusão, *C. diphtheriae* deve ser reconhecido como micro-organismo etiológico potencial de infecções relacionadas a cateter em populações de risco, incluindo pacientes idosos e com câncer. As amostras que apresentam os padrões de aderência LAL/AAL podem apresentar padrões de virulência que permitam que *C. diphtheriae* produza biofilmes eficazmente em superfícies de cateter. A formação de biofilme e a deposição de fibrina pode ter contribuído para a persistência de *C. diphtheriae* no cateter de nefrostomia e a sua obstrução.

Corynebacterium diphtheriae as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence

Débora L. R. Gomes,^{1†} Carlos A. S. Martins,^{1,2†} Lúcia M. D. Faria,² Louisy S. Santos,¹ Cintia S. Santos,¹ Priscila S. Sabbadini,¹ Mônica C. Souza,¹ Gabriela B. Alves,¹ Ana C. P. Rosa,¹ Prescilla E. Nagao,³ Gabriela A. Pereira,¹ Raphael Hirata, Jr¹ and Ana L. Mattos-Guaraldi¹

Correspondence

Ana L. Mattos-Guaraldi
guaraldi@pq.cnpq.br or
guaraldi@uerj.br

¹Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Medical Relevance, Faculty of Medicine, University of the State of Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Hospital Infection Control Committee, National Cancer Institute, INCA, Health Ministry, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Roberto Alcantara Gomes Biology Institute, University of the State of Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Corynebacterium diphtheriae still represents a global medical challenge, particularly due to the significant number of individuals susceptible to diphtheria and the emergence of non-toxicogenic strains as the causative agents of invasive infections. In this study, we characterized the clinical and microbiological features of what we believe to be the first case of *C. diphtheriae* infection of a percutaneous nephrostomy catheter insertion site in an elderly patient with a fatal bladder cancer. Moreover, we demonstrated the potential role of adherence, biofilm formation and fibrin deposition traits in *C. diphtheriae* from the catheter-related infection. Non-toxicogenic *C. diphtheriae* isolated from the purulent discharge (named strain BR-CAT5003748) was identified by the API Coryne system (code 1 010 324) and a multiplex PCR for detection of *dtxR* and *tox* genes. Strain BR-CAT5003748 showed resistance to oxacillin, ceftazidime and ciprofloxacin. In experiments performed *in vitro*, the catheter isolate was classified as moderately hydrophobic and as moderately adherent to polystyrene surfaces. Glass provided a more effective surface for biofilm formation than polystyrene. Micro-organisms adhered to ($>1.5 \times 10^6$ c.f.u.) and multiplied on surfaces of polyurethane catheters. Microcolony formation (a hallmark of biofilm formation) and amorphous accretions were observed by scanning electron microscopy on both external and luminal catheter surfaces. Micro-organisms yielded simultaneous expression of localized adherence-like and aggregative-like (LAL/AAL) adherence patterns to HEp-2 cells. Interestingly, the coagulase tube test resulted in the formation of a thin layer of fibrin embedded in rabbit plasma by the non-toxicogenic BR-CAT5003748 strain. In conclusion, *C. diphtheriae* should be recognized as a potential cause of catheter-related infections in at-risk populations such as elderly and cancer patients. LAL/AAL strains may be associated with virulence traits that enable *C. diphtheriae* to effectively produce biofilms on catheter surfaces. Biofilm formation and fibrin deposition could have contributed to the persistence of *C. diphtheriae* at the infected insertion site and the obstruction of the nephrostomy catheter.

Received 20 April 2009

Accepted 21 July 2009

INTRODUCTION

Infections due to bacteria that form biofilms are a clinical problem (Donlan, 2001; Rao *et al.*, 2008). The surfaces of indwelling medical devices are an excellent platform for the formation of life-threatening infections. Studies

[†]These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: AAL, aggregative-like; GBS, group B streptococcus; LAL, localized adherence-like.

(Christensen *et al.*, 1982; Marrie & Costerton, 1984) on the morphology of bacterial adherence to catheter lumen and external surfaces *in vitro* and *in vivo* showed abundant 'amorphous deposited substances' surrounding bacteria adherent to these surfaces. Biofilm-producing strains demonstrated an increased adherence to plastic surfaces as compared with non-biofilm-producing strains. Microorganisms from exogenous sources (such as the hands of personnel) or microflora indigenous to patients invade via the catheter insertion wound and migrate along the external catheter surface, eventually colonizing the catheter segment (Franson *et al.*, 1984).

Non-diphtherial corynebacteria have been reported to be infecting pathogens or copathogens in at-risk populations such as immunocompromised patients and patients with indwelling medical devices (Cavendish *et al.*, 1994; Esteban *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Dobler & Braveny, 2003; Schiff *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Teixido *et al.*, 2007; Dalal & Likhi, 2008).

Corynebacterium diphtheriae infections represent a global medical challenge, particularly due to the significant rise in the percentage of adults susceptible to diphtheria (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001) and the emergence of non-toxigenic strains as the causative agents of endocarditis and other systemic infections (Hirata *et al.*, 2008). This pathogen is also becoming successful in colonizing and persisting in the hospital environment (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001). *C. diphtheriae* is an uncommon cause of catheter-related infection and to our knowledge it has not been previously reported in the medical literature.

As a consequence of the awareness of severe *C. diphtheriae* infections, what we believe to be the first case of percutaneous nephrostomy catheter infection associated with *C. diphtheriae* came to our attention for further bacterial differentiation and determination of diphtheria toxin production. We characterized the clinical and microbiological features of this infection at the catheter insertion site of an elderly patient with neoplastic disease. Moreover, the study was undertaken to determine the ability of *C. diphtheriae* to deposit fibrin, to adhere to various substrates, and also to form biofilm.

METHODS

Clinical features. In December 2006, a 73-year-old man was admitted to the National Cancer Institute-INCA, Rio de Janeiro, Brazil, with a papillary urothelial carcinoma and bladder with diminished volume capacity (Ash grade II). A transurethral resection was performed. After 3 months, both haematuria and urinary incontinence persisted and a new CT scan showed bilateral pyelocaliceal dilation and reduction in size of both kidneys. The proposal for a radical cystectomy was frustrated due to comorbidities: severe malnutrition (weight loss of 15.8% within 3 months), smoking history (56 pack years), hypertension, diabetes mellitus and advanced age. He underwent percutaneous nephrostomy and radiotherapy consisting of 65 Gy given over a 35-week period. Sixteen months later, the patient was admitted into the intensive care unit for the replacement of the nephrostomy catheter due to malfunction. He was

anaemic (haemoglobin 4.8 g dl⁻¹), uraemic (blood urea nitrogen=59.8 mg dl⁻¹; creatinine=4.68 mg dl⁻¹) and hypoalbuminaemic (1.7 g dl⁻¹). Haematological analysis showed leukocytosis with high neutrophil counts (14 300 cells µl⁻¹ with 87% neutrophils) and lymphopenia (6.0%). The urine was dark yellow and turbid with numerous red blood cells, rare polymorphonuclear cells, Gram-positive cocci and irregular Gram-positive rods. Antibiotic therapy with meropenem was started empirically. Bacterial cultures of the urine revealed growth (1 × 10⁵ c.f.u. ml⁻¹) of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus, GBS). Signs of local infection at the ostium of the nephrostomy catheter were also noticed and the purulent discharge was Gram-stained and cultured. Bacterioscopic examination of the secretion revealed rare polymorphonuclear cells and rare irregular Gram-positive rods, while culture was positive for *C. diphtheriae* subsp. *mitis* and GBS. One set of blood cultures was performed and gave negative results. Specific antibiotic therapy was started with ampicillin for 10 days. The patient presented with persistent haemodynamic instability and anaemia, and evolved to acute myocardial infarction. Transurethral resection and cystostomy for withdrawal of intravesical clots were performed. The patient was discharged from the intensive care unit on the 10th day, and discharged from the hospital on the 17th day. Three weeks later, another replacement of the nephrostomy catheter was necessary due to obstruction. Microscopic analysis of the clinical sample obtained from the ostium of the nephrostomy showed some neutrophils, some Gram-negative bacilli and rare Gram-positive cocci. Culture showed the presence of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*; both were multisensitive to all the antibiotics tested. The bacterial cultures for *C. diphtheriae* gave negative results. Six months later, death occurred due to cancer progression.

Micro-organisms and identification procedures. Positive bacterial culture for irregular Gram-positive rods was preliminarily characterized by colonial morphology, pigmentation, haemolysis and DNase activity. Phenotypic characterization of *Corynebacterium*-like colonies was performed by conventional biochemical assays and the semi-automated API Coryne System (bioMérieux) with the API web decoding system (www.apisweb.biomerieux.com) (Efratiou & George, 1999; Funke & Bernard, 2007; Pimenta *et al.*, 2008b).

A multiplex PCR using three different primer pairs developed for detection of *C. diphtheriae* infection and differentiation between toxigenic and non-toxigenic strains was performed based on protocols described elsewhere: two primer pairs targeted to domains A and B of the *tox* gene and a third primer pair targeted to a region of the *dtcR* gene (Pimenta *et al.*, 2008a).

The non-toxigenic *C. diphtheriae* type strain ATCC 27010 [C7 s (-) tox- (NCTC 11397)] and the homologous toxigenic ATCC 27012 strain (tox+) from the American Type Culture Collection (USA), toxigenic strain CDC E-8392 (autoaggregative, highly hydrophobic, non-glass adherent, non-sucrose-fermenting) and toxigenic strain 241 (non-autoaggregative, weakly hydrophobic, glass adherent, sucrose-fermenting) were used as experimental controls.

Stock cultures in 10% skim milk with 25% added glycerol were maintained at -70 °C and recovered as required by cultivation in trypticase soy broth (TSB) (Hirata *et al.*, 2004).

Antimicrobial susceptibility testing. The disc diffusion method was performed in accordance with the guidelines provided by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Because of the absence of accepted breakpoints for coryneform bacteria into interpretative categories, those established by CLSI guidelines for organisms other than *Haemophilus* species and *Neisseria gonorrhoeae* were used (CLSI, 2007). The breakpoints for *Staphylococcus aureus* were considered for penicillin G, ampicillin and oxacillin (Pereira *et al.*, 2008).

Bacterial autoaggregation, and adherence to *n*-hexadecane assays. Bacterial spontaneous autoaggregation in TSB and the assays evaluating bacterial adhesion to *n*-hexadecane (BATH) were performed by methods previously described (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999b). Spontaneously autoaggregating strains and/or those with BATH values $\geq 50\%$ were considered to be highly hydrophobic, and non-aggregating strains or those with $30\% \leq \text{BATH values} < 50\%$ were considered to be moderately hydrophobic.

Biofilm formation on polystyrene surfaces. Biofilm formation was determined quantitatively in 96-well flat-bottomed polystyrene microtitre plates based on standard procedures (Stepanovic *et al.*, 2000). Briefly, 200 μl bacterial suspensions with an OD_{570} of 0.2 were applied to microplate wells. Negative controls contained TSB only. After incubation for 24 h at 37 °C, the content of each well was aspirated and washed three times with 200 μl PBS (pH 7.2). The remaining attached bacteria were fixed with 200 μl 99% methanol and stained with 2% crystal violet. The bound dye was then solubilized with 160 μl 33% glacial acetic acid and the OD_{570} of the solution was measured. The cut-off optical density (OD_c) was defined as the mean optical density of the negative control. All strains were classified as non- (0: $\text{OD} \leq \text{OD}_c$), weakly (+: $\text{OD}_c < \text{OD} \leq 2 \times \text{OD}_c$), moderately (++: $2 \times \text{OD}_c < \text{OD} \leq 4 \times \text{OD}_c$) or strongly (+++: $4 \times \text{OD}_c \leq \text{OD}$) adherent, based upon the ODs of bacterial films. Each assay was performed in triplicate and repeated three times.

Biofilm formation on surfaces of glass tubes. Micro-organisms were inoculated in glass tubes (13 \times 100 mm) containing 4 ml TSB and incubated for 48 h at 37 °C without shaking. The tubes were gently shaken for 5 s, and the supernatants containing bacterial cells that were not adherent to the surfaces of the glass tubes were discarded. TSB (4 ml) was then added, and the tubes were reincubated for 48 h. This procedure was repeated twice. The glass-adherent bacteria created a confluent coat of cells on the sides of the tube (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991).

In vitro model of catheter infection. Polyurethane 16-gauge percutaneous nephrostomy catheters (Intracath; Deseret Pharmaceutical) were used in the *in vitro* model system for evaluation of bacterial adherence and biofilm formation on catheter surfaces. Sterile 4 cm segments of polyurethane catheters were immersed for 24 h in 10^6 c.f.u. bacteria ml^{-1} suspended in TSB medium (Franson *et al.*, 1984).

Quantitative catheter culture and semiquantitative roll plate technique. Catheter segments infected *in vitro* with strain BR-CAT5003748 were cultured by using a quantitative (Dooley *et al.*, 1996) and a semiquantitative (Maki *et al.*, 1977) method on Columbia agar medium supplemented with 5% sheep blood for 24 h at 37 °C.

Scanning electron microscopy. *In vitro* specimens (sections of glass coverslips and polyurethane catheters) were fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated in a graded series of ethanol. Subsequently, catheter segments were subjected to critical point drying with carbon dioxide, covered with gold-palladium to a 10 nm layer and examined with a JEOL JSM 5310 scanning electron microscope. Sterile unused polyurethane catheters were also processed by scanning electron microscopy directly upon removal from commercial packaging. Catheter segments infected *in vitro* with *Staphylococcus epidermidis* were used as positive controls (Franson *et al.*, 1984).

HEp-2 cell adherence pattern assays. Patterns of adherence of bacteria to HEp-2 cells were assayed by previously described methods (Hirata *et al.*, 2004, 2008). Briefly, adherence assays were performed within semiconfluent HEp-2 cells grown on circular coverslips in

DMEM (Sigma) supplemented with 5% fetal calf serum, 50 μg gentamicin ml^{-1} , 2.5 μg amphotericin B ml^{-1} and 0.5% L-glutamine at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Micro-organisms were washed twice in 10 mM PBS (pH 7.2), resuspended in DMEM to a concentration of 10^7 c.f.u. ml^{-1} , and used in adherence assays (6 h). Giemsa-stained coverslips were examined by bright-field microscopy.

Bacterial interaction with rabbit plasma. The coagulase test was based on procedures described for *S. aureus* strains (Christensen *et al.*, 1983). EDTA-chelated rabbit plasma was obtained from Ebe Farma Biológica e Agropecuária LTDA (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Tests were performed in 9 \times 100 mm glass test tubes with chelated rabbit plasma diluted in PBS to 1:4. Since a positive test for coagulase production results in a clotting of the rabbit plasma, any degree of clotting was considered as positive due to the absence of parameters for *C. diphtheriae* in this assay. Results were reported across a range 0–4+; 0 meaning the plasma remained liquid (no coagulase activity) and 4+ meaning the plasma completely hardened (the consistency of an agar) due to strong coagulase activity. The coagulase reaction was read until 24 h post-incubation at 37 °C. All '0' results were held at room temperature for an additional 24 h incubation. Positive (4+, *S. aureus*) and negative (0, *S. epidermidis*) controls were included in the study.

RESULTS AND DISCUSSION

Strain BR-CAT5003748 produced the numerical pattern 1010324 in the API Coryne system, which was identified by the API Coryne database as *C. diphtheriae* subsp. *mitis* with 95.9% probability ($T=0.99$). The primer set for the *tox* gene used in the multiplex PCR assay gave negative results (Fig. 1). Strain BR-CAT5003748 was susceptible to ampicillin, cefepime, ceftriaxone, erythromycin, imipenem, vancomycin, ceftazidime, gentamicin and penicillin G and resistant to oxacillin, ciprofloxacin and ceftazidime.

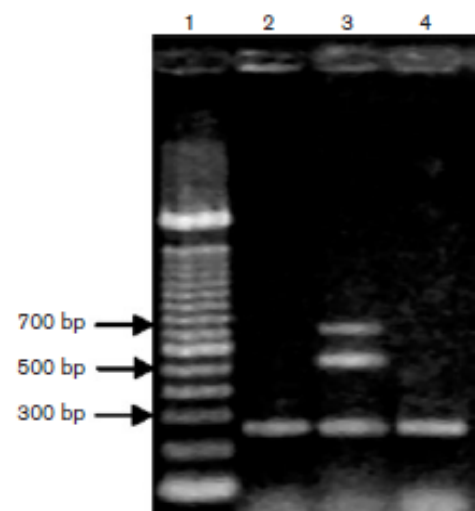


Fig. 1. Results of multiplex PCR for identification of *C. diphtheriae* and detection of the *tox* gene. Lanes: 1, 100 bp DNA ladder; 2, BR-CAT5003748 test strain; 3, ATCC 27012 toxigenic control strain; 4, ATCC 27010 non-toxigenic control strain.

A review of the current literature indicated that polymicrobial infections occur frequently (15%) in immunocompromised patients with cancer (Eltting *et al.*, 1986; Rolston *et al.*, 2007). Compared with monomicrobial infections, polymicrobial infections in both neutropenic and non-neutropenic patients are associated with greater morbidity and mortality. The authors emphasized that there is only limited information concerning the spectrum and microbiology of these infections. Data regarding polymicrobial infections and nonbacteraemic infections are often incomplete or not provided at all. For cancer patients, the array of potential pathogens is wide, and opportunistic agents should be taken into account in addition to conventional micro-organisms. The list is constantly growing. Specific microbiological diagnosis is barely established because of the lack of clear distinction between colonization and infection. There is no clear definition of opportunistic infection, and the differentiation between conventional pathogens and opportunistic agents is not well defined (Klastersky & Aoun, 2004). Many laboratories do not process culture specimens from voided or catheterized urine, drainage from intra-abdominal or pelvic collections, or infected surgical sites when multiple organisms are recovered. In most instances, these culture results are simply reported as 'normal site flora' or 'contaminated specimens', without identification of the organisms to the species level, including *Corynebacterium* species.

Accordingly, the virulence capacity of *Corynebacterium* species should not be underestimated, particularly in high-risk patients (Klastersky & Aoun, 2004; Oudiz *et al.*, 2004). Fortunately, in most of the reported cases of catheter-related infections caused by non-diphtherial corynebacteria, the patients were treated successfully with antibiotics and without removal of the catheter (Wang *et al.*, 2001; Dobler & Braveny, 2003; Oudiz *et al.*, 2004; Schiffel *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Teixido *et al.*, 2007; Dalal & Likhi, 2008). In contrast to most of the reported cases of catheter-related infections caused by non-diphtherial corynebacteria species, in the case reported here removal of the catheter was mandatory.

The isolation of non-toxicogenic *C. diphtheriae* and GBS strains from the ostium of a percutaneous nephrostomy catheter provided evidence that both micro-organisms can be implicated in catheter-related infections. It may be the case that these two pathogens had a synergistic effect on the development of a co-infection.

GBS infection causes substantial morbidity and mortality among adults, particularly in elderly persons (mean age 71 years), those with significant underlying diseases such as cancer, those with a prior history of urinary tract infections or with an indwelling urinary catheter, and those with anatomical abnormalities of the urinary tract. Urinary tract infection is the clinical diagnosis for 39% of adults >70 years of age with invasive GBS disease. GBS has been associated with the infection of intravenous catheters,

arterial lines and an intravenous pacemaker wire. However, co-infection with *S. aureus* is common in patients who have a GBS infection that is associated with the presence of an intravascular device (Farley, 2001). Since GBS is isolated from the catheter insertion site, and from the urine of the patient, a pathogenic role of GBS is feasible.

While lower bacterial counts at the catheter insertion site argue more for colonization than infection, this last possibility cannot be excluded, particularly among immunocompromised patients. This motivated the analysis of virulence factors exhibited by the *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 strain that could have effectively contributed to the establishment of the catheter-related infection.

Biofilm formation is a well-known pathogenic mechanism in device-related infections in hospitals (Stewart & Costerton, 2001). Some bacteria, including non-diphtherial corynebacteria species (Marrie & Costerton, 1984; Soriano *et al.*, 1993, 2008; Olson *et al.*, 2002; Kwaszewska *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007), have a natural tendency to adhere to available biotic and/or abiotic surfaces and to form biofilms.

The developmental biology of biofilm formation can be characterized into three stages: the initial attachment, development of microcolony formation, and detachment (O'Toole *et al.*, 2000). The general findings from the literature indicate that two properties are often associated with biofilm-producing bacteria, namely the increased synthesis of exopolysaccharide and the development of antibiotic resistance (Costerton *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2008). The presence of exopolysaccharide surrounding bacteria in clinical specimens has been observed to be associated with symptomatic catheter infections. Other factors such as the presence of trace metals (Aranha *et al.*, 1982) and hydrophobicity (Rosenberg, 1981) may also be important in such interactions.

Little is known concerning biofilm formation by *C. diphtheriae*. In earlier studies, different levels of adherence to glass surfaces were observed among *C. diphtheriae* strains. Most of the strains (71%) exhibiting lower haemagglutinating activity were predominantly effective adherers to glass surfaces (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991). Bacterial autoaggregating properties in liquid media and hydrophobicity were also observed among *C. diphtheriae* strains (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999b). *C. diphtheriae* strains tested were able to adhere to negatively charged plastic (polystyrene) surfaces as recently observed with *Corynebacterium urealyticum* (Soriano *et al.*, 2008). For lipophilic skin corynebacteria, autoaggregation in liquid media and hydrophobicity were statistically connected with biofilm formation on solid surfaces (Kwaszewska *et al.*, 2006). For *C. diphtheriae* strains, autoaggregation in liquid media and hydrophobicity were related to biofilm formation on polystyrene surfaces, but not to biofilm formation on positively charged glass surfaces (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991).

Table 1. *C. diphtheriae* adhesive properties to different substrates

BATH, bacterial adherence to *n*-hexadecane; LA, localized adherence, microcolonies attach to small areas on the cells; DA, diffuse adherence, bacteria cover the tissue culture cells uniformly; AA, autoaggregating bacteria grown in liquid medium; -, negative; +, positive; ++, moderately positive; +++, strongly positive.

Strain	Biofilm formation		Hydrophobicity		Pattern of adherence to HEP-2 cells
	Glass	Polystyrene	AA	% BATH	
BR-CAT5003748	+++*	++	-	35	LAL/AAL
241	+++*	++	-	33	LA
CDC E-8392	-†	++	+	51	DA

*Confluent coat of bacterial cells on the sides of the tubes and localized adherence on glass surfaces where the culture medium is in contact with the air.
†No visible adherence.

Amorphous deposited substances or glycocalyx have been noted covering *C. diphtheriae* cells (Moreira *et al.*, 2003). Previous studies indicated the presence of exopolysaccharides on the surfaces of *C. diphtheriae* cells (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999a) which can be also produced by organisms such as coagulase-negative staphylococci (Christensen *et al.*, 1982, 1983) and *Pseudomonas aeruginosa* (Chan *et al.*, 1984). *C. diphtheriae* strains exhibited surface saccharide ligands such as *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine, galactose, mannose-like and sialic acid residues, but at different levels. The sialic acid-rich regions contribute to

creating a negative charge on the surface of the cells. The presence of an exposed sialic acid moiety was predominantly observed on surfaces of glass-adherent *C. diphtheriae* (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999b). Moreover, *C. diphtheriae* strains seemed to withstand oxidative environmental stress partly due to their biofilm-forming abilities (Silva De Souza *et al.*, 2003). The expression of exopolysaccharides on the bacterial cells and the ability to adhere to glass surfaces were drastically decreased when *C. diphtheriae* strains were submitted to growth under iron-limiting conditions (Moreira *et al.*, 2003).

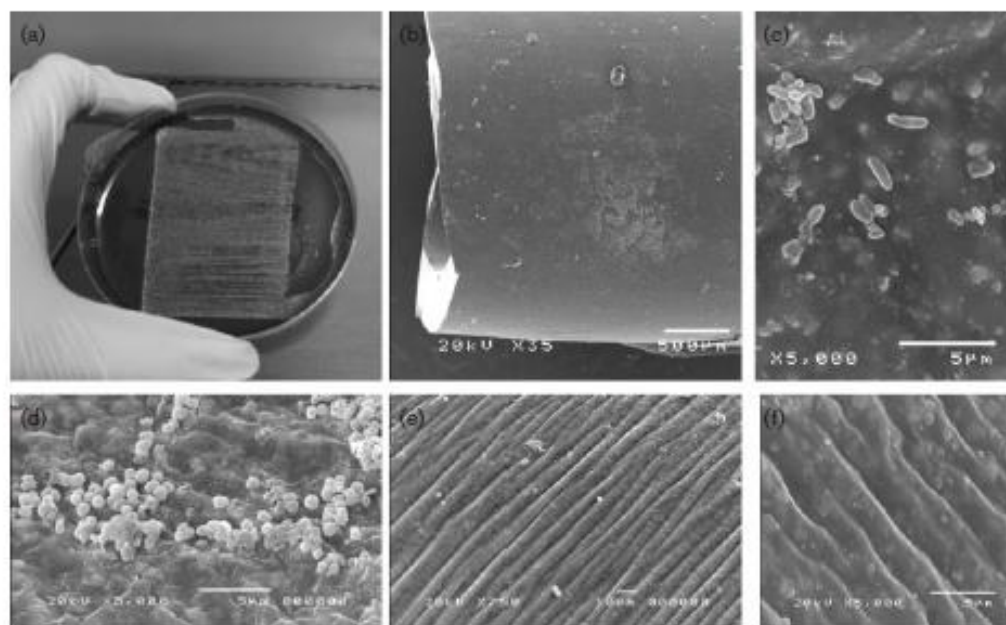


Fig. 2. *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 biofilm production on the surface of an *in vitro* prepared polyurethane percutaneous nephrostomy catheter. (a) Segments of polyurethane catheter semiquantitative culture exhibiting confluent growth of *C. diphtheriae* BR-CAT5003748; (b, c) scanning electron micrographs of biofilm formation on the outer surface of a bisected polyurethane catheter; (d) accretions on catheters infected *in vitro* with *S. epidermidis* (positive control) showing coccoid bacteria within a confluent biofilm; (e, f) the surface of an unused sterile polyurethane percutaneous nephrostomy catheter, characterized by multiple gentle linear irregularities.

For *C. diphtheriae*, the mechanisms by which bacterial colonization of catheters occurs have yet to be defined. The studies highlighted above have examined factors which may relate to this phenomenon. Like other *C. diphtheriae* strains, the non-toxigenic BR-CAT5003748 strain was weakly hydrophobic and unable to autoaggregate in liquid media but was capable of adhering to polystyrene and glass surfaces (Table 1).

Segments of polyurethane catheters were colonized *in vitro* by the *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 strain. A large amount of biofilm material was evident (Figs 2 and 3). For *S. epidermidis* strains used as a positive control, in some areas the cocci were coated with slime (Fig. 2). Similarly, for *C. diphtheriae*, bacterial cells coated with slime (condensed glycocalyx) were also observed on polyurethane surfaces (Fig. 3). Evaluation of adherence and viability of micro-organisms on polyurethane catheter segments by the semiquantitative roll plate method (>15 c.f.u.) and by the quantitative catheter culture assays ($>1.5 \times 10^6$) showed that viable cells of the non-toxigenic *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 strain extensively adhered to and multiplied on the surfaces of polyurethane catheters (Fig. 2).

Fig. 3 illustrates microcolony formation on a luminal catheter surface (Fig. 3a, b) and on a glass surface (Fig. 3c). Amorphous accretions and micro-organisms coated by slime were observed on the polyurethane surface, but not on the glass. Therefore, strain BR-CAT5003748 showed properties similar to those of other human pathogens that are biofilm producers. As for *Acinetobacter baumannii* (Rao *et al.*, 2008), we have observed the ability of the BR-CAT5003748 strain to attach to and form microcolonies on glass surfaces. As for non-diphtherial *Corynebacterium* species (Marrie & Costerton, 1984; Soriano *et al.*, 1993), cells of *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 also appeared to form matrix-enclosed microcolonies on *in vitro* colonized polyurethane surfaces.

Different catheter materials have varying affinities for bacterial adherence (Franson *et al.*, 1984). Polyurethane implanted subcutaneously in mice was accompanied by an infiltration of erythrocytes and subsequent haemolysis possibly resulted from a positive charge associated with this plastic, attracting negatively charged cells (Rigdon, 1970). In this study, *C. diphtheriae* produced biofilm on both the luminal and external surfaces of polyurethane catheters. Similar to observations with other Gram-positive pathogens, the gentle nature of the surface irregularities probably does not fully account for trapping *C. diphtheriae* on polyurethane catheter surfaces. In accordance with previous observations with glass surfaces (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991), adherence of *C. diphtheriae* to polyurethane may be partially explained by a positive electric charge associated with this polymer. Moreover, the amorphous deposited substances or glycocalyx noted surrounding *C. diphtheriae* microcolonies on the surfaces of polyurethane catheters suggest that the bacteria may produce or attract substances that strengthen their attachment to inert surfaces *in vitro*.

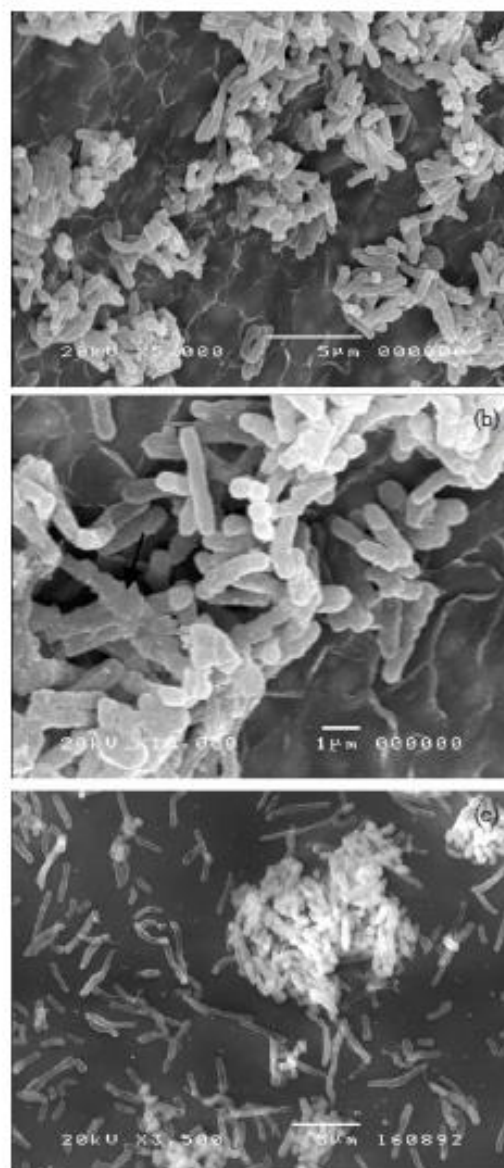


Fig. 3. Scanning electron micrographs illustrating biofilm formation by *C. diphtheriae* on the inner surface of a bisected polyurethane catheter and on a glass surface. (a) A large amount of biofilm material exhibiting bacterial microcolonies and amorphous material on the catheter surface is evident. (b, c) Formation of microcolonies on the surfaces of a polyurethane catheter (b) and a glass coverslip (c). Bacterial cells coated with slime (condensed glycocalyx) were observed on the polyurethane surface (arrow).

Biofilm formation is a common phenomenon in the pathogenesis of enteroaggregative *E. coli* (EAEC). Multiple genes associated with biofilm formation are regulated by *aggR*, a global regulator of EAEC virulence (Mohamed *et al.*, 2007). The presence of atypical adherence patterns has been linked to new *E. coli* virulence categories. The localized adherence-like (LAL) pattern is characterized by the presence of less-compact microcolonies or clusters of bacteria in a few cells observed only in tests with prolonged

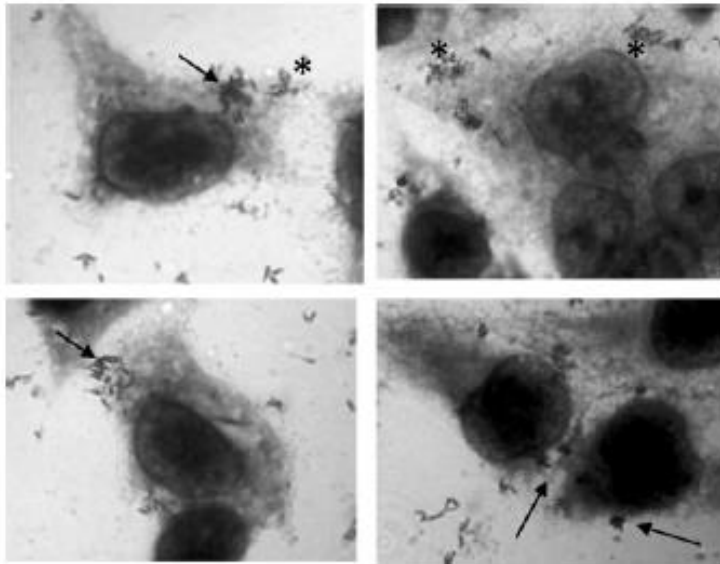


Fig. 4. Micrographs of HEp-2 cell adherence assay (6 h incubation) demonstrating a mixed LAL/AAL pattern exhibited by the biofilm-producing *C. diphtheriae* subsp. *mitis* BR-CAT5003748 strain isolated from the catheter insertion site. LAL (arrows), bacteria attached to localized areas of the HEp-2 cells, forming loose microcolonies; AAL (asterisk), bacteria aligned in parallel rows adhered to both tissue culture cells and glass. Magnification $\times 1000$.

incubation periods (6 h) (Scaletsky *et al.*, 1999). *E. coli* strains isolated from immunocompromised patients may express simultaneously features of three (localized, aggregative and diffuse) adherence patterns (Polotsky *et al.*, 1997) while some *E. coli* strains not belonging to any recognized classes of diarrhoeagenic *E. coli* may present a mixed aggregative-like (AAL)/LAL pattern (Bouzari *et al.*, 1994).

Differing degrees of attachment to HEp-2 monolayers with a predominance of localized and diffuse adherence patterns were previously observed for *C. diphtheriae* strains isolated from throat and skin lesions (Hirata *et al.*, 2004). Recent studies also indicated a pathogenic role of aggregative-adhering (AA) *C. diphtheriae* in invasive disease (Hirata *et al.*, 2008). Previous studies suggested biofilm-forming ability among *C. diphtheriae* strains expressing the LAL (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Hirata *et al.*, 2004) and AAL (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998) patterns.

In the present study, microcolony formation (a hallmark of biofilm formation) by strain BR-CAT5003748 was observed on epithelial cell surfaces as well as on polyurethane and glass surfaces. Micro-organisms were found attached to localized areas of the HEp-2 cells, forming loose microcolonies, which characterizes a LAL pattern. BR-CAT5003748 cells also adhered to the epithelial cell surface, to the glass substratum, and to each other in a distinctive stacked-brick formation, but without the typical honeycomb formation, which characterizes an AAL adherence pattern (Fig. 4). For EAEC, this atypical AAL adherence pattern was named B type (Wakimoto *et al.*, 2004). Therefore, strain BR-CAT5003748 expressing biofilm-forming ability on the surfaces of polyurethane catheters showed simultaneous features of LAL and AAL patterns to HEp-2 cells. Similarly to *E. coli*, the existence of atypical and mixed adherence patterns may indicate a new mechanism of disease production by *C. diphtheriae*.

The coagulase reaction resulted in fibrin deposition (level 2+) by *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 with formation of a large pellicle resembling a pseudomembrane formed inside the test tubes (Fig. 5). Pellicle formation was not observed for *S. aureus* (4+) or *S. epidermidis* (0) control strains.

Intrinsic catheter surface properties, bacterial surface features, and perhaps coating with host substances may all play a role in bacterial attachment to catheter surfaces. Although fibrin production is one of the primary host defences against infection, a common cause of catheter malfunction is obstruction by a fibrin sheath. Catheter tips may show deposits composed of fibrin and cells occluding the inner lumen. Moreover, the encasement of fibrin,

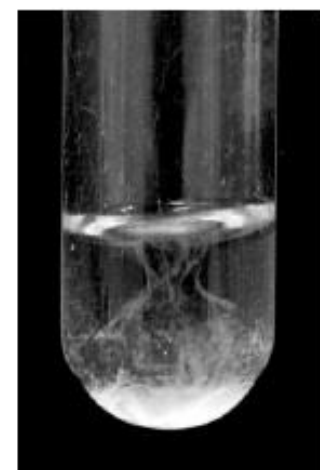


Fig. 5. Micrograph demonstrating the positive coagulase reaction of *C. diphtheriae* strain BR-CAT5003748. Note the formation of a large pellicle of fibrin embedded in plasma.

plasma proteins, platelets and other undefined substances around the external catheter surface may provide a niche conducive to bacterial implantation. It is possible that fibrin deposition on the catheter can be stimulated by subclinical infection (Franson *et al.*, 1984; Bousquet-Rouaud *et al.*, 1993). In addition to bacterial growth and biofilm production on luminal surfaces, fibrin deposition is a characteristic of *C. diphtheriae* strains that may contribute to catheter malfunction. Data suggest that this ability of *C. diphtheriae* may have contributed to catheter obstruction and to the establishment of both pathogens at the ostium of the nephrostomy in this study.

In conclusion, diphtheria bacilli are capable of adhering to catheters and inducing infections in susceptible hosts. *C. diphtheriae* may form biofilm on polyurethane catheters *in vivo* possibly by an adherent biofilm mode of growth as on polyurethane surfaces *in vitro*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by INCA, FAPERJ, CNPq, SR-2/UERJ, Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX) and Programa Nacional de Pós-Doutorado-PNPD (CAPES/MEC). We also thank Wagner Oliveira Brito and Jorge Ari da Cruz for technical assistance.

REFERENCES

- Aranha, H., Strachan, R. C., Arceneaux, J. E. L. & Byers, B. R. (1982). Effect of trace metals on growth of *Streptococcus mutans* in a teflon chemostat. *Infect Immun* 35, 456–460.
- Bousquet-Rouaud, R., Castex, F., Costalat, G., Bastide, M., Hedon, B., Bouanani, M., Jouvert, S. & Mirouze, J. (1993). Factors involved in catheter obstruction during long-term peritoneal insulin infusion. *Diabetes Care* 16, 801–805.
- Bouzari, S., Jafari, A., Farhodi-Moghaddam, A. A., Shokouhi, F. & Parsi, M. (1994). Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *J Med Microbiol* 40, 95–97.
- Cavendish, J., Cole, J. B. & Ohl, C. A. (1994). Polymicrobial central venous catheter sepsis involving a multiantibiotic-resistant strain of *Corynebacterium minutissimum*. *Clin Infect Dis* 19, 204–205.
- Chan, R., Lam, J. S., Lam, K. & Costerton, J. W. (1984). Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 19, 8–16.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. & Beachey, E. H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 37, 318–326.
- Christensen, G. D., Parisi, J. T., Bisno, A. L., Simpson, W. A. & Beachey, E. H. (1983). Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 18, 258–269.
- CLSI (2007). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, pp. 4–6. Approved Guideline. CLSI document M45-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Dalal, A. & Likhi, R. (2008). *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. *J Infect* 56, 77–79.
- Dobler, G. & Braveny, I. (2003). Highly resistant *Corynebacterium macginleyi* as cause of intravenous catheter-related infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22, 72–73.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7, 277–281.
- Dooley, D. P., Garcia, A., Kelly, J. W., Longfield, R. N. & Harrison, L. (1996). Validation of catheter semiquantitative culture technique for non staphylococcal organisms. *J Clin Microbiol* 34, 409–412.
- Efstratiou, A. & George, R. C. (1999). Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. *Commun Dis Public Health* 2, 250–257.
- Elting, L. S., Bodey, G. P. & Fainstein, V. (1986). Polymicrobial septicemia in the cancer patient. *Medicine* 65, 218–225.
- Esteban, J., Nieto, E., Calvo, R., Fernandez-Robals, R., Valero-Guillen, P. L. & Soriano, F. (1999). Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18, 518–521.
- Farley, M. M. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis* 33, 556–561.
- Franson, T. R., Sheth, N. K., Rose, H. D. & Sohnle, P. G. (1984). Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J Clin Microbiol* 20, 500–505.
- Funke, G. & Bernard, A. K. (2007). Coryneform Gram-positive rods. In *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 485–514. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, J. H. Tenover & R. H. Tenover. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Hirata, R., Jr, Souza, S. M., Rocha-de-Souza, C. M., Andrade, A. F., Monteiro-Leal, L. H., Formiga, L. C. & Mattos-Guaraldi, A. L. (2004). Patterns of adherence to HEP-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microb Pathog* 36, 125–130.
- Hirata, R., Jr, Pereira, G. A., Filardy, A. A., Gomes, D. L. R., Damasco, P. V., Rosa, A. C. P., Nagao, P. E., Pimenta, F. P. & Mattos-Guaraldi, A. L. (2008). Potential pathogenic role of aggregative adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res* 41, 986–991.
- Klastersky, J. & Aoun, M. (2004). Opportunistic infections in patients with cancer. *Ann Oncol* 15, iv329–iv335.
- Kwaszewska, A. K., Brewczynska, A. & Szweczyk, E. M. (2006). Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. *Pol J Microbiol* 55, 189–193.
- Lee, P. P., Ferguson, D. A., Jr & Sarubbi, F. A. (2005). *Corynebacterium striatum*: an underappreciated community and nosocomial pathogen. *J Infect* 50, 338–343.
- Maki, D. G., Weise, C. E. & Sarafin, H. W. (1977). A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 296, 1305–1309.
- Marrie, T. J. & Costerton, J. W. (1984). Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intravenous and intra-arterial catheters. *J Clin Microbiol* 19, 687–693.
- Mattos-Guaraldi, A. L. & Formiga, L. C. D. (1991). Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Braz J Med Biol Res* 24, 399–406.
- Mattos-Guaraldi, A. L. & Formiga, L. C. D. (1998). Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr Microbiol* 37, 156–158.
- Mattos-Guaraldi, A. L., Cappelli, E. A., Previato, J. O., Formiga, L. C. D. & Andrade, A. F. B. (1999a). Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. *FEMS Microbiol Lett* 170, 159–166.

- Mattos-Guaraldi, A. L., Formiga, L. C. D. & Andrade, A. F. B. (1999b). Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol* 38, 37–42.
- Mattos-Guaraldi, A. L., Formiga, L. C. D., Camello, T. C. F., Pereira, G. A., Hirata, R., Jr & Halpern, M. (2001). *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev Argent Microbiol* 33, 96–100.
- Mohamed, J. A., Huang, D. B., Jiang, Z. D., DuPont, H. L., Nataro, J. P., Belkind-Gerson, J. & Okhuysen, P. C. (2007). Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J Clin Microbiol* 45, 121–126.
- Moreira, L. de O., Andrade, A. F. B., Vale, M. D., Souza, S. M. S., Hirata, R., Jr, Asad, L. M. O. B., Asad, N. R., Monteiro-Leal, L. H., Previato, J. O. & Mattos-Guaraldi, A. L. (2003). Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl Environ Microbiol* 69, 5907–5913.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G. & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66, 86–92.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54, 49–79.
- Oudiz, R. J., Widlitz, A., Beckmann, X. J., Camanga, D., Alfie, J., Brundage, B. H. & Barst, R. J. (2004). Micrococcus-associated central venous catheter infection in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 126, 90–94.
- Pereira, G. A., Pimenta, F. P., Santos, F. R., Damasco, P. V., Hirata, R., Jr & Mattos-Guaraldi, A. L. (2008). Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 507–510.
- Pimenta, F. P., Hirata, R., Jr, Rosa, A. C. P., Milagres, L. G. & Mattos-Guaraldi, A. L. (2008a). A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxicogenic and toxicogenic isolates. *J Med Microbiol* 57, 1438–1439.
- Pimenta, F. P., Souza, M. C., Pereira, G. A., Hirata, R., Jr, Camello, T. C. F. & Mattos-Guaraldi, A. L. (2008b). DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* 46, 307–311.
- Polotsky, Y., Nataro, J. P., Kotler, D., Barrett, T. J. & Orenstein, J. M. (1997). HEP-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea. *J Clin Microbiol* 35, 1952–1958.
- Rao, R. S., Karthika, R. U., Singh, S. P., Shashikala, P., Kanungo, R., Jayachandran, S. & Prashanth, K. (2008). Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 26, 333–337.
- Rigdon, R. H. (1970). Hemolysis associated with plastics – a histopathologic study with polyurethane. *J Biomed Mater Res* 4, 57–71.
- Rolston, K. V. I., Bodey, G. P. & Safdar, A. (2007). Polymicrobial infection in patients with cancer: an underappreciated and under-reported entity. *Clin Infect Dis* 45, 228–233.
- Rosenberg, M. (1981). Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol* 42, 375–377.
- Scaletsky, I. C., Pedroso, M. Z., Oliva, C. A., Carvalho, R. L., Morais, M. B. & Fagundes-Neto, U. A. (1999). Localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect Immun* 67, 3410–3415.
- Schiffli, H., Mucke, C. & Lang, S. M. (2004). Exit-site infections by non-diphtheria corynebacteria in CAPD. *Perit Dial Int* 24, 454–459.
- Silva De Souza, S. M., Hirata, R., Jr, Moreira, L. O., Gomes, M. L., Braga De Andrade, A. F., Bemardo-Filho, M. & Mattos-Guaraldi, A. L. (2003). Influence of stannous chloride on the adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Int J Mol Med* 12, 657–661.
- Soriano, F., Ponte, C. & Galiano, M. J. (1993). Adherence of *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2) and *Corynebacterium jeikeium* to intravascular and urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12, 453–456.
- Soriano, F., Huelves, L., Naves, P., Rodriguez-Cerrato, V., Del Prado, G., Ruiz, V. & Ponte, C. (2008). *In vitro* activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *J Antimicrob Chemother* 63, 353–356.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Davic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40, 175–179.
- Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
- Suzuki, T., Lihara, H., Uno, T., Hara, Y., Ohkusu, K., Hata, H., Shudo, M. & Ohashi, Y. (2007). Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 45, 3833–3836.
- Teixido, J., Arias, N., Tarrats, L. & Romero, R. (2007). The microbial pattern of the catheter exit-site infection in peritoneal dialysis: a non-diphtheria corynebacteria emergence? *Nefrología* 27, 350–358.
- Wakimoto, N., Nishi, I., Sheikh, I., Nataro, J. P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M. & Kawano, Y. (2004). Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg* 71, 687–690.
- Wang, C. C., Mattson, D. & Wald, A. (2001). *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. *Bone Marrow Transplant* 27, 445–449.

DISCUSSÃO

No presente estudo, foram demonstrados casos de processos infecciosos relacionados com micro-organismos pertencentes ao gênero *Corynebacterium* em pacientes com câncer. Os resultados obtidos permitiram a redação de quatro artigos científicos. Aspectos microbiológicos e clínicos de casos de corinebacterioses em pacientes com câncer observados durante período de cinco anos foram descritos no **Artigo 1**. No **Artigo 2** foram apresentados os casos de bacteremias causadas por espécies de corinebactérias não produtoras de toxina diftérica em pacientes atendidos no INCA-Rio de Janeiro nos períodos de 2003/2004 e 2012/2013. Infecções em pacientes com câncer causadas pelo principal agente etiológico da difteria, *C. diphtheriae* foram descritas nos **Artigos 3 e 4**.

O gênero *Corynebacterium* compreende atualmente 115 membros e 95 espécies, que incluem 53 espécies clinicamente relevantes em patologia humana (Hollis, 1992; Holmes, 2005; Bernard, 2012). Nestas espécies estão incluídos micro-organismos ambientais e componentes da microbiota anfibiótica humana e de animais que são considerados de baixa patogenicidade, porém capazes de causar infecções em pacientes com imunodeficiências, portadores de dispositivos vasculares e naqueles internados por longos períodos em hospitais e clínicas de repouso. Além das infecções oportunistas, nas últimas décadas tem sido observado um crescente número de casos de infecções zoonóticas.

As topografias humanas e as espécies comumente encontradas são: na faringe e pele *C. pseudodiphtheriticum*; no saco conjuntival e nasofaringe; no conduto auditivo externo *C. auris* e na narina anterior e pele *C. striatum*. Comumente encontrados fazendo parte da pele humana, estão *C. xerosis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. striatum*, *C. minutissimum*, *C. jeikeium*, *C. urealyticum* e *Arcanobacterium haemolyticum*. A colonização por *C. jeikeium* e *C. urealyticum* ocorre em pacientes hospitalizados, portadores de doenças malignas, imunodeficiência grave, exposição prolongada ao ambiente e a equipe assistencial. Particularmente susceptíveis são os pacientes hematológicos com neutropenia e dispositivos intravasculares. As regiões frequentemente colonizadas pelo *C. jeikeium* são as axilas, virilhas e o períneo (Holmes, 2005). Os reservatórios animais podem ser os bovinos, ovelhas e pombos para *Arcanobacterium pyogenes*, os bois e cavalos para *C. ulcerans*, ovelhas, cabras, cavalos e bovinos para *C. pseudotuberculosis*, enquanto que *Rhodococcus* proveem do solo rico em excrementos de herbívoros. As infecções zoonóticas por *C. ulcerans* estão implicadas

a ingestão de leite *in natura* e as atribuídas ao *C. pseudotuberculosis* ao trato animal e a ingestão de leite não pasteurizado.

Além de *C. diphtheriae*, diversas outras espécies de corinebactérias têm emergido como importantes patógenos. No entanto, os relatos sobre a epidemiologia das corinebactérias em países em desenvolvimento são bastante restritos.

As várias espécies de *Corynebacterium* e outros corineformes como parte integrante da microbiota humana, podem ser contaminantes de amostras clínicas e exigem uma correta análise sobre a relevância clínica. Na mesma direção, é importante não descartar arbitrariamente as amostras de corinebactérias isolados de materiais clínicos como contaminantes ou como constituintes da flora normal. Amostras isoladas de topografias normalmente estéreis, culturas repetidamente positivas, germe único ou em número significativamente proeminente, conferem essa relevância. Destaca-se o aumento do número de infecções oportunistas causadas por corinebactérias e outros micro-organismos corineformes em decorrência de uma maior sobrevivência de pacientes gravemente imunocomprometidos e o aumento do número e tipos de dispositivos médicos invasivos utilizados tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em imunocompetentes (Clarke *et al.*, 1999; Knox & Holmes, 2002; Daniels *et al.*, 2003; Chiu, *et al.*, 2005).

Corinebactérias pertencentes a um grupo de bactérias habitualmente consideradas saprófitas ou contaminantes, oriundas do solo, poeira, material orgânico ou água, além de encontradas na microbiota da pele humana e de mucosas não têm sido devidamente valorizadas como agentes infecciosos. A importância da infecção pela espécie *C. jeikeium* está relacionada à sua resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos e a necessidade de retirada do cateter venoso central. Os cateteres venosos centrais de longa permanência são suportes vitais no tratamento de pacientes oncológicos, seja durante o tratamento quimioterápico, no aporte nutricional, e no necessário suporte clínico. As espécies *C. jeikeium*, *C. urealyticum* e *C. amycolatum* podem apresentar-se resistentes a diferentes agentes antimicrobianos. Além disso, amostras de *C. minutissimum*, *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. pseudodiphtheriticum* e *C. macginleyi* vêm apresentando aumento de resistência adquirida. São descritas variações geográficas na frequência de isolamento e conseqüentemente também na resistência antimicrobiana natural e adquirida. No Rio de Janeiro, 68% dos isolados no ambiente de um hospital universitário corresponderam a *C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. propinquum* e *C. minutissimum*. Nesse estudo, a urina e o acesso venoso foram os sítios mais freqüentemente acometidos. No sangue e trato respiratório, predominaram *C. pseudodiphtheriticum* e *C. propinquum*, enquanto que *C. xerosis* e *C.*

amycolatum predominaram em cateteres venosos. Em feridas cirúrgicas foram observadas com mais frequência *C. propinquum* e *C. minutissimum* (Camello *et al.*, 2003).

Os dados apresentados no **Artigo 1** demonstraram que durante um período de cinco anos, 932 cepas oriundas de materiais clínicos de pacientes com câncer, enviadas para diagnóstico infeccioso, em tratamento no INCA foram identificadas como corinebactérias. As espécies predominantes foram *C. amycolatum* (44,7%), *C. minutissimum* (18,3%) e *C. pseudodiphtheriticum* (8,5%).

As fontes mais frequentes do *C. amycolatum* foram o trato urinário superior, a ferida cirúrgica, o trato respiratório inferior, os tumores ulcerados e os cateteres venosos. As infecções pelo *C. jeikeium* ocorreram principalmente nos pacientes neutropênicos que portavam cateter venoso central, enquanto que as infecções por *C. amycolatum* e por outras espécies ocorreram principalmente em pacientes diagnosticados com tumores sólidos. Em 86% dos casos as culturas positivas provieram de pacientes diagnosticados como infectados, confirmados pelo diagnóstico clínico quanto microbiologicamente. Desses, 77,1% estavam hospitalizados sendo 71,1% em enfermarias cirúrgicas. O tumor sólido do adulto foi o tipo de doença maligna mais comumente encontrada (66,7%). A análise estatística (uni e multivariada) evidenciou que os pacientes hospitalizados tinham seis vezes maior risco relacionado com a mortalidade até ao trigésimo dia do início da infecção (infecção índice).

Uma vez que o gênero em questão possui significativa complexidade taxonômica, no período do estudo, os métodos moleculares permitiram a identificação de novos gêneros e espécies e reagrupamento tanto de antigos gêneros quanto novas espécies. Devido a essa imprecisão diagnóstica foram excluídas as primeiras 507 cepas referentes aos três anos iniciais do nosso estudo. Nos dois últimos anos (2003/2004) foram analisadas 430 cepas oriundas de 315 pacientes com corinebacterioses confirmadas por diagnóstico clínico e bacteriológico. O substancial aumento encontrado na frequência do *C. amycolatum* deveu-se ao desaparecimento do *C. xerosis* e à significativa redução dos isolados de *C. striatum* e do *C. minutissimum*, reflexos do progresso na identificação mais precisa dessas espécies. Os antigos grupos *Corynebacterium* CDC F-2 e CDC I-2 foram reclassificados como *C. amycolatum*.

A identificação ao nível de espécie influi diretamente na variabilidade do padrão de sensibilidade aos antimicrobianos. Apesar de muitas infecções causadas por corinebactérias poderem ser efetivamente tratadas empiricamente com antibióticos e cuidados locais, testes de susceptibilidade são altamente recomendados, principalmente em pacientes imunossuprimidos submetidos à pressão seletiva de antibióticos e à internação hospitalar prolongada. A importância da separação do complexo *xerosis-amycolatum* não é somente devido à

dificuldade inicial da correta separação dessas duas espécies e sim às implicações terapêuticas. Enquanto *C. xerosis* é multissensível aos antibióticos, *C. amycolatum* é multirresistente. Este fato pode explicar a alta prevalência da espécie *C. amycolatum* neste estudo em uma população imunossuprimida com câncer e submetida à pressão seletiva de antibióticos. Uma análise multivariada evidenciou um risco seis vezes maior de óbito no 30º dia nos pacientes infectados quando hospitalizados, nos acamados por pelo menos 50% do tempo do período diurno, com neoplasia em progressão e (ou) diabetes.

No INCA, a espécie predominante foi *C. amycolatum* diferentemente do encontrado na literatura médica de língua inglesa. Em virtude da predominância do *C. amycolatum* nos processos infecciosos, esta espécie foi avaliada quanto à sua frequência em infecções persistentes e à sensibilidade aos agentes antimicrobianos. Os maiores índices de resistência primária foram observados para os antimicrobianos ceftazidima (91,2%) e oxacilina (91,6%). Percentuais de resistência altos também foram observados para eritromicina (46,6%), cloranfenicol (62,6%), penicilina (31,8%) e ampicilina (31%). Resistência também foi observada para os aminoglicosídeos: amicacina (26,2%) e tobramicina (36,8%). Entre os beta-lactâmicos, as resistências a cefazolina (15%), ao ceftriaxone (18,9%) e ao imipeném (14,9%) foram comparativamente mais baixas. Todas as cepas de *C. amycolatum* testadas foram sensíveis a vancomicina. Surpreendente foi o significativo aumento da resistência a cefepima nas cepas persistentes ($\chi^2 = 32,74$; $p < 0,0001$). Também foi detectado nessas mesmas cepas, aumento da resistência a amicacina ($\chi^2 = 2,52$; $p = 0,1124$) e a ciprofloxacina ($\chi^2 = 2,52$; $p = 0,1122$) (Martins, 2008).

A vancomicina, uma droga de eficácia clínica comprovada, deve ser reservada para infecções graves invasivas e para as cepas multirresistentes. Quando houver opções alternativas através dos testes de sensibilidade, deve-se racionalizar o uso da vancomicina. O uso intensivo de glicopeptídeos tem demonstrado indução de resistência em *S. aureus* e *Enterococcus* (Howden *et al.*, 2010). Todas as 430 amostras de corinebactérias isoladas de sítios anatômicos diversos foram uniformemente vancomicina-sensíveis. A vancomicina foi à única droga efetiva para *C. jeikeium*. Outras espécies que demonstraram multirresistência aos agentes antimicrobianos foram *C. urealyticum* com sensibilidade à vancomicina e quinolonas (ciprofloxacina e ofloxacina), além de *C. minutissimum* e *C. amycolatum*. As espécies que demonstraram maior sensibilidade aos antibióticos testados foram: *C. pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium* grupo G, *C. argentoratense* e *C. propinquum*. Deste modo, os resultados obtidos no presente estudo, permitem sugerir que na possibilidade de iniciar terapêutica empírica, antes da confirmação da espécie, as melhores opções seriam, além da vancomicina,

os aminoglicosídeos, cefalosporinas de 1^a, 3^a (exceto ceftazidima), 4^a Geração e os carbapenêmicos. A ceftazidima, oxacilina e eritromicina foram muito pouco efetivas, exceto para *C. pseudodiphtheriticum*. Os dados iniciais, descritos na dissertação de mestrado (Martins, 2008), também permitiram demonstrar o desenvolvimento de resistência, em infecções persistentes de *C. amycolatum* para cefepima e de *C. pseudodiphtheriticum* para ceftriaxone. Estes dados podem refletir uma propensão ao desenvolvimento de resistência em antibióticos beta-lactâmicos, nas infecções por corinebactérias em pacientes com câncer.

As cepas que mostraram maior resistência intrínseca aos antibióticos foram *C. jeikeium* e *C. urealyticum*, apesar de todas as espécies mostrarem uma tendência a adquirir resistência em pacientes internados. *C. amycolatum* com resistência adquirida predominou nos pacientes cirúrgicos enquanto *C. jeikeium* predominou em pacientes neutropênicos febris portadores de cateteres venosos de longa permanência. Em nossa população houve predomínio da *C. amycolatum* e *C. pseudodiphtheriticum* que predominaram tanto em pacientes ambulatoriais quanto em pacientes internados, sendo que as amostras hospitalares em pacientes com internações prolongadas e com infecções persistentes, que mostraram tendência a adquirir resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Os pacientes hospitalizados também mostraram colonização e infecção por *C. striatum* e *C. jeikeium*.

A partir de meados de 1990, com a melhor caracterização das espécies de *Corynebacterium*, foi significativo o aumento de *C. amycolatum*, sendo que CIM em 90% dos isolados necessitaram de concentrações inibitórias maiores ou iguais a 32 microgramas/ml para a maioria dos agentes antimicrobianos. Cepas multirresistentes de *C. amycolatum* tem sido descritas como responsáveis por múltiplas e graves infecções com alta morbi-mortalidade (Funke *et al.*, 1996). Diversos casos anteriormente reportados como infecções causadas por *C. xerosis* e *C. minutissimum* foram posteriormente confirmados etiológicamente como causados por *C. amycolatum*. O crescente número de artigos publicados relatando a importância de *C. amycolatum* na etiologia de uma variedade de processos infecciosos reflete a melhoria na identificação dessa espécie (Berner *et al.*, 1997; Vanechoutte *et al.*, 1998; von Graevenitz *et al.*, 1998; de Miguel *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 1999; Knox & Holmes, 2002; Camello *et al.*, 2003; Daniels *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2005).

As características clínicas dos pacientes com corinebacterioses foram comparadas entre os casos de evolução favorável e os casos fatais. Devido à limitação do presente trabalho, que é um estudo retrospectivo, não foi possível investigar a mortalidade atribuída às diferentes espécies de *Corynebacterium* em relação à mortalidade no trigésimo dia nos pacientes com câncer. Pela mesma razão, não foi possível estabelecer fatores prognósticos

nesses pacientes, considerando as características descritivas. Outra limitação do estudo foi à exclusão dos isolados dos anos 2000 a 2002 na análise completa devido às grandes mudanças na classificação taxonômica. Entretanto, os dados demonstrados, neste estudo, nos permitiram detectar alguns padrões e características da população investigada. A análise estatística univariada e multivariada demonstrou que pacientes hospitalizados tinham seis vezes maior risco de morrer quando relacionada à mortalidade no trigésimo dia. Também havia significância estatística nos pacientes acamados em mais que 50% do período diurno, nas doenças neoplásicas em progressão e nos casos de diabetes melito.

Os resultados do presente estudo indicaram que as corinebactérias devem ser reconhecidas como causa de infecção em pacientes com câncer. Apesar de frequentemente ocorrer subnotificação de casos, principalmente em países em desenvolvimento, estes microorganismos podem ser responsáveis por aproximadamente 4% dos casos de infecção em pacientes que apresentam tumores sólidos. Os dados refletem uma tendência para a infecção ou colonização por *Corynebacterium* em pacientes com câncer que se submeteram a procedimentos cirúrgicos e a longos períodos de internação. Os dados do estudo enfatizaram também a necessidade de identificação até ao nível de espécie, visto que, os padrões de sensibilidade natural e adquirida variam de espécie para espécie. *Corynebacterium* isolados em diferentes materiais clínicos, especialmente em pacientes com febre persistente, devem ser valorizados e identificados como o sítio atribuível à infecção. A semelhança da descrição por outros autores, em nosso estudo, os casos de infecção por *C. jeikeium* ocorreram principalmente em pacientes neutropênicos que usaram cateteres venosos centrais (Rozdzinski *et al.*, 1991), enquanto que a infecção por *C. amycolatum* foram detectadas principalmente em pacientes com tumores sólidos.

Os dados apresentados no **Artigo 2** enfatizaram que nas últimas décadas, espécies de corinebactérias não diftéricas têm sido relacionadas com quadros de infecções invasivas graves como as bacteremias. A bacteremia é uma complicação grave e potencialmente fatal especialmente em pacientes imunocomprometidos com câncer. Em 1976, foi relatado caso da septicemia causada por *Corynebacterium sp* resistente a todos antibióticos, exceto a vancomicina e comprovada a infecção cruzada e a colonização hospitalar pelo novo patógeno (Young *et al.*, 1981). A presente análise do comportamento das bacteremias com um intervalo de oito anos, na mesma população e no mesmo ambiente do hospital, permitiu observar o comportamento e epidemiologia dessas infecções ao longo de um médio prazo. No centro de referência de câncer (INCA) do Rio de Janeiro, em dois períodos de dois anos e separados por um intervalo de sete anos, 62 casos de bacteremias foram observados, no primeiro período de

2003-04 ($n= 38$) e no segundo período de 2012-13 ($n= 24$), em pacientes portadores de câncer. Os quadros de bacteremia causadas por *Corynebacterium sp* foram observados em pacientes portadores de doenças linfoproliferativas (43,5%), tumores sólidos pediátricos (14,5%), tumores primitivos do SNC incluindo um linfoma (4,8%) e tumores sólidos do adulto (1%). No momento da realização da hemocultura, 32,3% dos pacientes apresentavam neutropenia. A mediana de idade e de hospitalização foi de 55,5 anos e de 16 dias, respectivamente.

A maioria dos pacientes com câncer que desenvolveu quadro de bacteremia era portadora de cateter venoso central (87,1%), sendo que 75,9% foram implicados em infecções relacionadas ou associadas ao cateter. As infecções cateter-relacionadas foram 56,3% com o cateter de silicone de longa permanência e em 18,2% com os cateteres de poliuretano de curta permanência. As infecções cateter-associadas foram 21,9% para os cateteres de silicone e 54,5% para os de poliuretano. Utilizando a metodologia NNIS em vigilância prospectiva pela CCIH encontramos para os cateteres de silicone de longa permanência, tipo Hickmann 7,2 infecções por 1000 cateteres/dia, e para os cateteres de poliuretano de curta duração 17,7 infecções/1000 cateteres/dia. As infecções não atribuídas ao cateter foram 21 episódios de bacteremia secundária a um foco à distância ou a uma bacteremia primária em que o cateter foi excluído como a fonte de infecção (bacteremia indeterminada ou bacteremia primária não atribuída ao cateter).

Os resultados demonstraram que na primeira fase do estudo (2003-04) 18 pacientes tinham cateter venoso de silicone de longa duração (16 Hickmann, 1 Port e 1 PICC), 18 pacientes tinham cateter venoso de poliuretano de curta duração (17 CP-CVC e 1 HD) e dois portadores de acesso venoso periférico (P-CV). Na segunda fase do estudo (2012-13), 14 pacientes tinham cateter venoso de silicone de longa duração (8 Hickmann, 5 Port e 1 PICC), 4 pacientes tinham cateter venoso de poliuretano de curta duração (4 CP-CVC) e seis acesso venoso periférico (P-CV). Nessa segunda fase do estudo houve maior número de pacientes em tratamento ambulatorial (97,4% *versus* 54,2%). Em consequência houve maior utilização dos cateteres totalmente implantados tipo Port e de acesso venoso periférico.

A população estudada apresentou como doença de base 47,3% e 37,5% de doenças linfoproliferativas no primeiro e segundo período, respectivamente. No segundo período, enquanto os tumores sólidos do adulto tiveram um pequeno recuo (39,5% para 33,3%), os tumores pediátricos elevaram de 10,5% para 20,8% assim como, os tumores do sistema nervoso central de 1,6% para 8,3%.

Em relação às espécies encontradas nas duas fases do estudo, houve maior diversificação das espécies (sete versus 10 espécies) no segundo período. Houve uma queda de 40% na frequência de *C. amycolatum*. Houve o aparecimento de espécies relacionadas com a multirresistência como *C. urealyticum*, *C. striatum* e aumento de *C. propinquum* e das espécies não classificadas. Resumidamente as espécies *C. amycolatum* (n= 25/6) e *C. jeikeium* (n= 5/6) foram os mais comuns isolados nas bacteremias. As demais espécies isoladas do sangue de pacientes com câncer foram *C. afermentans* (n= 2/3), *C. argentoratense* (n= 2/1), *C. aquaticum* (renomeada *Leifsonia aquatica*; n= 2/0), *C. propinquum* (n= 1/3) e *C. minutissimum* (n= 1/1). As novas espécies encontradas foram *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. Grupo G* e três espécies não classificadas.

Uma vez que no intervalo de sete anos a ciência médica evoluiu tanto no tratamento das doenças neoplásicas quanto na oferta de novos antimicrobianos com atividade para bactérias Gram-positivas, além de determinar as novas espécies potencialmente patogênicas, um outro objetivo do nosso estudo foi monitorizar a ocorrência da resistência bacteriana tanto intrínseca quanto a adquirida em pacientes tratados no INCA. No período de dois anos, a primeira fase com 38 e a segunda com 24 cepas de *Corynebacterium* oriundas de pacientes com câncer, encontramos 100% de sensibilidade a vancomicina e a linezolida, sendo que a linezolida só foi testada no segundo período do estudo. As bacteremias por *C. amycolatum* mostraram sensibilidade de 92% e 66,7 para aminoglicosídeo, ciprofloxacina de 50 para 20%, eritromicina de 60 para 30%, penicilina, carbapenêmicos e cefalosporina de 4ª geração permaneceram estáveis. Todas as amostras de *C. jeikeium* estudadas foram resistentes para todas as outras opções além da vancomicina e linezolida.

Interessantemente, no primeiro período de estudo as cepas de *C. propinquum* isoladas de quadros de infecção persistente apresentaram resistência a todos os antibióticos testados, exceto vancomicina e, no segundo período, foram observadas cepas com sensibilidade a cefalosporina de 4ª geração e carbapenêmico. *C. afermentans* teve sensibilidade variável a penicilina e eritromicina e as novas espécies encontradas somente no segundo período de estudo, essas demonstraram comportamento diverso do encontrado nos relato de casos (Soriano *et al.*, 1993; Soriano *et al.*, 1995; Soriano *et al.*, 2008; Ortiz-Perez *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2012). *C. urealyticum* e *C. striatum* mostraram-se multissensíveis, sendo a primeira isolada de uma retite actínica em tumor de reto terminal com sepse polimicrobiana (*E. Coli* e *C. urealyticum*), internada com choque irreversível e, *C. striatum* foi associado à reinfecção do cateter pós amica-lock e preservação do cateter com vanco-lock. *C. minutissimum*

multiresistente foi isolado de pneumonia aspirativa crônica e celulite facial em tumor de cabeça e pescoço.

No INCA, *C. pseudodiphtheriticum* apresentou comportamento epidemiológico semelhante ao *C. amycolatum*, em relação a frequência de isolamentos. Foi observado aumento progressivo dos isolados dessa espécie juntamente com a diminuição simultânea do *C. minutissimum*. Esse comportamento observado no período de 2000 a 2002, pode ser explicado pela melhoria das técnicas fenotípicas de identificação e redefinição das classificações provisórias. No segundo período (2003/2004), foram observadas 53 cepas de *C. pseudodiphtheriticum*, oriundas de 317 pacientes, sendo que 10 pacientes apresentavam infecção persistente pelo *C. pseudodiphtheriticum*. O comportamento das cepas persistentes desses pacientes tratados com múltiplos esquemas terapêuticos de antibióticos mostrou que houve desenvolvimento de resistência microbiana. O aumento da resistência desenvolveu-se em 13 dos 15 antimicrobianos testados “in vitro”, exceto quanto à resistência a vancomicina e ao imipeném. O maior impacto relativo à resistência foi frente aos antibióticos beta-lactâmicos, especialmente a ceftriaxona ($\chi^2 = 3,38$; $p = 0,004$) (Martins, 2008). Também na cidade do Rio de Janeiro, em um período de 14 anos, 113 estirpes foram isoladas de pacientes infectados por *C. pseudodiphtheriticum* de várias topografias, e selecionados por idade e doença de base (Camello *et al.*, 2009). No INCA, *C. pseudodiphtheriticum* representou 8,5% (79 cepas) das cepas, sendo a terceira corinebactéria mais isolada. Dos 315 pacientes com corinebacteriose, *C. pseudodiphtheriticum* representou 12,4% (39 pacientes), sendo o segundo germe mais frequente. As topografias diferiram significativamente entre as populações do HUPE e do INCA. Urina, sangue, cateter venoso e peritonite por diálise peritoneal predominaram no HUPE, enquanto no INCA predominaram as sinusites (19 casos), pneumonias (11 casos) e supuração de ferida cirúrgica (4 casos). No INCA não foram detectados casos em urina e não há programa de hemodiálise para pacientes com insuficiência renal crônica.

A epidemiologia das infecções, em pacientes neutropênicos tem sofrido mudanças nos últimos 40 anos, segundo dados do International Antimicrobial Therapy Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). A frequência de bactérias Gram-positivas em hemoculturas aumentou de 28% para 67% desde o EORTC-I ao EORTC IX (17 anos de acompanhamento) em pacientes neutropênicos (Klastersky, 1998). As hemoculturas no INCA mostraram que os micro-organismos Gram-positivos corresponderam a 50,3% dos isolados no período de cinco anos (2000-2004) e que após o intervalo de sete anos subiu para 52,9%. Embora as infecções causadas por *Corynebacterium*

sp tenham maior incidência em populações de áreas tropicais, as publicações sobre essas populações são raras (Camello *et al.*, 2003; Camello *et al.*, 2009; Rizvi *et al.*, 2011; Baio *et al.*, 2013). *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. urealyticum* e *C. afermentans*, ao lado de *C. minutissimum* e *C. jeikeium* são frequentemente isolados. Os dados da presente investigação enfatizaram um aumento dos isolamentos de *C. amycolatum* e *C. jeikeium* em pacientes imunocomprometidos. Essas diversas espécies têm tanto os marcadores de resistência natural quanto aos de resistência adquirida aos agentes antimicrobianos, o que dificulta o tratamento empírico dos pacientes (Rizvi *et al.*, 2011).

Devido à alta frequência de isolamentos em pacientes com câncer, outros estudos são necessários para investigar a patogenicidade de *C. amycolatum*, desde que, indivíduos imunossuprimidos estão aumentando em nossa sociedade devido aos procedimentos médicos como transplantes de órgãos, tratamento de câncer, SIDA e outras intervenções médicas que envolvem imunossupressão, para melhorar a qualidade de vida de portadores de doenças crônicas. Essas são situações em que *Corynebacterium sp*, em especial *C. amycolatum*, pode expressar plenamente suas propriedades patogênicas (Oteo *et al.*, 2001).

As várias espécies multirresistentes de *Corynebacterium*, principalmente *C. amycolatum* e *C. jeikeium*, podem ser comumente encontrados ao longo dos anos no ambiente hospitalar, como agentes etiológicos de graves infecções sistêmicas tanto em pacientes com doenças linfoproliferativas quanto em portadores de tumores sólidos submetidos a cirurgias radicais, quimioterapia, radioterapia ou a uma combinação delas. A agressividade da doença neoplásica parece aumentar o risco de septicemia por corinebactérias, bem como o tempo de internação hospitalar e o uso de cateter venoso central.

As características clínicas das malignidades com bacteremia por *C. amycolatum* ($n = 31$), foram 12 pacientes com doenças linfoproliferativas, 19 com tumores sólidos, incluindo 14 tumores sólidos do adulto, quatro tumores sólidos pediátricos, e um tumor cerebral. Oito pacientes apresentavam neutropenia febril. Um paciente estava usando cateter de hemodiálise e 26 estavam usando CVC, incluindo 14 com cateter venoso de longa permanência e 12 com cateter de curta permanência. *C. amycolatum* foi a espécie isolada em todas três situações.

Corynebacterium jeikeium é um micro-organismo multirresistente que faz parte da microbiota da pele humana e que pode causar infecções em pacientes imunossuprimidos usando dispositivos médicos invasivos (Rozdzinsk *et al.*, 1991; Zinner, 1999; Holmes, 2005). O grupo de maior risco são os pacientes neutropênicos portadores de cateter intravascular, com neutropenias prolongadas ou quando submetidos a procedimentos cirúrgicos extensos, além do uso esquemas de múltiplos antibióticos. Estudos anteriores demonstraram que *C.*

jeikeium era capaz de colonizar até 40% dos pacientes hospitalizados (Zinner, 1999; Holmes, 2005). No presente trabalho, *C. jeikeium* foi isolado em nove pacientes dos 62 pacientes com bacteremia, sendo que em cinco pacientes havia bacteremia causada pelo cateter (relacionada ao cateter) e duas bacteremias associadas ao cateter (uma associada à sinusite e uma associada à pneumonia) e duas bacteremias, sendo uma causada por neutropenia febril e uma pneumonia em que o do cateter foi excluído como a fonte originária. Ao referir à doença de base foram sete doenças linfoproliferativas, um linfoma do SNC e um tumor de reto.

As demais oito espécies apresentaram frequência menor e mais irregular, exceto para *C. afermentans* e *C. propinquum* com cinco e quatro isolamentos, respectivamente. *C. afermentans*, espécie esta que está associada com infecções de enxertos acometeu três pacientes com acesso periférico, sendo dois tumores colorretais obstrutivos e uma sepse urinária também obstrutiva, além de dois pacientes portadores de doença linfoproliferativa, sendo uma tromboflebite séptica em um menino de 14 anos com a LLA e em um paciente submetido a transplante autólogo por LNH e infecção sistêmica (cateter e pulmonar). *C. propinquum* que acometeu no primeiro período um paciente portador de tumor colorretal obstrutivo e infecção sistêmica por *C. propinquum* multirresistente (só sensível a vancomicina) e três isolamentos no segundo período. Uma LMA, em paciente de 23 anos, em recaída com neutropenia febril e uma criança de 4 anos e tumor de Wilms, não-neutropênica, ambos com infecção cateter-relacionada e tratados com vanco-lock e preservação do cateter (Fernandez-Hidalgo *et al.*, 2006).

As características clinico-epidemiológicas foram comparadas em dois períodos distintos intervalado por sete anos, buscando alterações na população atendida, na doença de base, na frequência das espécies e sensibilidade aos antimicrobianos. As principais mudanças ocorridas do primeiro para o segundo período foram: a diminuição dos pacientes internados de 97,4% para 54,2% ($p < 0,001$) e do uso de cateteres venosos de 94,7% para 75,0% ($p = 0,02$). Entretanto no segundo período, houve um maior número de episódios febris (13,2% para 37,5%; $p = 0,03$) e de hipotensão arterial.

No **Artigo 3** foram descritos aspectos clínico-epidemiológicos de dezessete casos de isolamento de *Corynebacterium diphtheriae* em pacientes com suspeita ou confirmação de neoplasia em um centro de referência para o tratamento de câncer no período de 1996-2013. Os seguintes fatores motivaram a referida investigação: mudança na epidemiologia das infecções em pacientes neutropênicos, aumento na frequência de isolamento de bactérias Gram-positivas em hemoculturas em pacientes neutropênicos (Klustersky, 1998), maior sobrevivência dos pacientes com imunossupressão (Martins, 2008), terapia de resgate de tumores

avançados (Zembower, 1998; Yamaguti & Mendonça, 2006), aumento populacional dos idosos além de relatos de casos causados por corineformes e corinebactérias, inclusive de cepas de *C. diphtheriae* não toxigênicas invasivas (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998; Camello *et al.* 2009) e perda do reforço natural para *C. diphtheriae*, além da recente epidemia de difteria ocorrida nos países da antiga União Soviética (Dittmann, 1997).

O INCA é um centro especializado no tratamento de doenças malignas e suas complicações. Os pacientes são referidos de outros hospitais e centros médicos com diagnóstico confirmado ou com alto grau de suspeição de doença maligna. Todos os pacientes independentemente do caso confirmado, são submetidos a revisão histopatológica e alguns exames complementares antes da sua matrícula. Todos os casos descritos aqui passaram por este processo e os casos benignos foram matriculados para tratamento por forte suspeita diagnóstica de câncer e sem possibilidade de confirmação a nível ambulatorial.

Depois de implantados programas nacionais de imunização, a difteria tornou-se doença rara, principalmente nos países industrializados (Holmes, 2005). Atualmente, muitos clínicos podem nunca ter visto um caso semelhante e, portanto, perder a oportunidade de fazer o diagnóstico (Bowler *et al.*, 1988). Da mesma forma, os laboratórios de microbiologia clínica não pesquisam rotineiramente *C. diphtheriae* em swabs de orofaringe ou outros materiais clínicos (Begg & Balraj, 1995). O diagnóstico da difteria não é clinicamente fácil, principalmente quando os indivíduos encontram-se parcialmente imunizados. Nos casos de média gravidade são facilmente confundidos com faringite estreptocócica e a presença da clássica pseudomembrana pode estar ausente, particularmente em pacientes que foram previamente vacinados. Espécies toxigênicas como *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* podem desenvolver infecções sinérgicas necrotizantes associadas com bactérias anaeróbicas.

Durante dezessete anos, quadros de infecção pelo *C. diphtheriae* foram diagnosticados em dezessete pacientes em tratamento no INCA (Rio de Janeiro, Brasil), incluindo dois pacientes com doença não maligna simulando câncer. No INCA, o diagnóstico desses casos foi estabelecido se um paciente tinha sinais e sintomas de infecção e uma cultura (de qualquer sítio) foi positiva para *C. diphtheriae*. Foram identificadas cepas toxigênicas e atoxigênicas pertencentes aos biotipos *gravis*, *mitis* e *belfanti*, fermentador e não fermentador de sacarose. No presente estudo, as manifestações da lesão inflamatória aguda causada pelo *C. diphtheriae* estavam associadas a outras bactérias oportunistas em todos os casos, exceto em um caso de cultura pura. As bactérias frequentemente associadas à infecção polimicrobiana foram *Streptococcus* em 13 casos (40.6%), *Staphylococcus* em 10 (31.3%), bacilos Gram-negativos em seis (18.8%), corineformes em dois (6.2%) e um caso em cultura

pura. Este fato dificulta ainda mais o diagnóstico laboratorial de quadros de infecções atípicas pelo *C. diphtheriae*, principalmente quando causados por cepas atoxinogênicas.

A maioria dos pacientes que desenvolveram infecção pelo *C. diphtheriae* era portadora de tumores sólidos. A incidência de casos foi de 15,8 casos por 100.000 admissões. Na população de pacientes referenciados ao INCA com diagnóstico ou suspeita de câncer, a incidência de infecção pelo *C. diphtheriae* foi 465 vezes maior que a de casos de difteria encontrada na população brasileira.

Os testes de susceptibilidade têm sido problemáticos em corineformes e o uso de antibióticos em pacientes com câncer e infecção oportunista pode não erradicar a colonização e nem tratar a infecção por *C. diphtheriae*. Eritromicina, clindamicina e penicilina G não são drogas comumente usadas como esquema inicial em pacientes com câncer e neutropenia febril. *C. diphtheriae* é um germe não usual em acometer pacientes imunossuprimidos com câncer, apesar de continuar endêmico em muitos países e ocorrer em grupos populacionais susceptíveis. Idosos são particularmente predispostos por ausência de um reforço natural e pela perda dos anticorpos protetores vacinais da infância. Acrescentamos a esses, os pacientes sem história de reforço vacinal e portadores de doença neoplásica em progressão, além de tumores ulcerados ou com sequelas de tratamento cirúrgico e (ou) radioterápico.

A população atendida no INCA veio referida por outros hospitais e postos de atendimento de todos os níveis, com diagnóstico já confirmado de neoplasia ou para confirmação de casos clinicamente suspeitos de neoplasia. Todos passaram pelo setor de triagem do INCA e foram matriculados para tratamento oncológico ou para confirmação do diagnóstico neoplásico inicial. Quanto a origem da população atendida: um paciente era originário de Olinda, região metropolitana de Recife, Pernambuco, região Nordeste do Brasil, um de Vila Velha, região metropolitana de Vitória, Espírito Santo, região Sudeste, quatro de municípios do Estado do Rio de Janeiro, quatro da região do Grande Rio e sete de bairros da cidade do Rio de Janeiro. Em comum, nessa população, era a baixa escolaridade e baixo poder econômico. A distribuição populacional não sugeria um padrão de surto e sim de endemicidade.

A cidade do Rio de Janeiro, com uma população de 6.300.000 pessoas na área urbana e 12.300.000 na área metropolitana, está localizada na região sudeste, a região mais desenvolvida do Brasil. A rápida urbanização e consequente inchaço das grandes cidades brasileiras, criaram guetos urbanos que levaram a degradação das condições ambientais, os níveis de baixa renda dessa população, violência, drogas e ocupação das encostas dos morros cariocas por favelas, além de políticas clientelistas, têm dificultado as atividades de controle

pelo Estado, levando a uma deterioração dos serviços públicos no que diz respeito a saneamento, educação e comunicação, resultando no surgimento de doenças infecciosas como a dengue (Lourenço-de-Oliveira, 2008) e difteria. Por isso faltam dados epidemiológicos confiáveis para determinar a incidência real dessas doenças de notificação compulsória na população em geral e nos bolsões de pobreza.

Esse trabalho é um estudo de uma série de casos com o intuito de, a partir de um caso de difteria de transmissão intra-hospitalar diagnosticada (referência-18), levantar a incidência da difteria na população dos pacientes referidos ao INCA e descrever a apresentação de formas clínicas não usuais, tanto as formas toxinogênicas quanto as não toxinogênicas. Não houve a pretensão de estudar fatores de risco, morbidez e mortalidade e a força dessas associações na população, pela inadequação do modelo de estudo. Esse trabalho é um estudo preliminar exploratório, em vista da pobreza de relatos na literatura (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001). A maior incidência foi em tumores sólidos, tanto em pacientes adultos quanto em pediátricos. Apenas um caso foi de linfoma abdominal (Linfoma de Burkitt) com acometimento cerebral.

Os sinais e sintomas clínicos da difteria não puderam ser atribuídos unicamente às manifestações da difteria, devido aos fatores de confusão relacionados com a idade, quimioterapia, radioterapia, síndrome paraneoplásica e patologias pré-existentes (Rampini *et al.*, 2009). Nos casos com apresentação sugestiva, a suspeita foi confirmada somente após o isolamento e identificação do *C. diphtheriae*. O diagnóstico inicial foi sempre de recaída tumoral, complicação do tratamento quimioterápico e(ou) radioterápico, infecções oportunistas ou por doença neoplásica em progressão. O tratamento antibiótico com ceftazidima e oxacilina mostrou-se com taxa de efetividade muito baixa e a ampicilina, amicacina e o metronidazol, quando foram substituído por cefazolina/oxacilina, resultou em um óbito precoce (12 dias). A ceftriaxona sozinha ou associada à ciprofloxacina, necessitou de cobertura adicional com um macrolídeo para erradicação da cepa infectante. A incidência de difteria na população de pacientes com câncer referenciada ao INCA foi de cerca de um caso ao ano, sendo que nos últimos quatro anos não foi observado nenhum caso, provavelmente pela adoção da vacina bacteriana dupla DT nos adultos e idosos.

A presença de pacientes imunossupressos com câncer, submetidos à terapia imussupressora, em ambiente de internação hospitalar e usando variados dispositivos médicos invasivos em região com insatisfatória cobertura vacinal e circulação endêmica do *C. diphtheriae*, motivou todo o estudo cujos resultados foram publicados no **Artigo 4** intitulado

“*Corynebacterium diphtheriae* como um patógeno emergente em infecção relacionada a cateter de nefrostomia: análise de propriedades associadas à virulência bacteriana”.

C. diphtheriae ainda representa um desafio de Saúde mundial, particularmente ao significativo número de indivíduos susceptíveis à difteria e à emergência de cepas não toxinogênicas causadoras de doença invasiva. Neste estudo, foi caracterizado um quadro clínico e microbiológico do que se acredita ser o primeiro caso de infecção pelo *C. diphtheriae* do sítio de inserção de um cateter de nefrostomia percutânea em um paciente idoso com câncer invasivo de bexiga. Além disso, foi demonstrado o papel potencial da aderência, da formação do biofilme e da deposição da fibrina pelo *C. diphtheriae* na infecção relacionada ao cateter. *C. diphtheriae* não toxinogênico isolado da drenagem purulenta (cepa nomeada BR-CAT 5003748) foi identificada pelo Sistema de galeria API Coryne (código 1 010 324) e por PCR multiplex para detecção dos genes “*tox*” e “*dtxR*”. A cepa BR-CAT 5003748 era resistente a oxacilina, ceftazidima e ciprofloxacina. Em experimentos “in vitro”, essa cepa isolada do cateter, foi classificada como moderadamente hidrofóbica e moderadamente aderente à superfície de poliestireno. O vidro mostrou-se uma superfície mais eficaz na formação do biofilme do que o poliestireno. Os micro-organismos aderiram ($>1,5 \times 10^6$ UFC) e multiplicaram-se na superfície do cateter de poliuretano. A formação de microcolônias (a importante marca da formação do biofilme) e concreções amorfas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura, tanto na superfície externa quanto na superfície interna do cateter. Os micro-organismos expressaram simultaneamente padrão de aderência e agregação localizadas (LAL/AAL), como padrão de aderência à células HEp-2. Interessantemente, o teste da coagulase em tubo, com plasma de coelho, resultou na formação de uma fina camada de fibrina pela cepa não toxinogênica BR-CAT 5003748. Em conclusão, *C. diphtheriae* pode ser reconhecido como um patógeno com potencial de causar de infecção relacionada ao cateter, em populações de risco como pacientes idosos e com câncer. As cepas LLA/AAL podem ser associadas com fatores de virulência que permitem *C. diphtheriae* produzir biofilme na superfície de cateteres. A formação de biofilme e a deposição de fibrina que pode ter contribuído para a persistência do *C. diphtheriae* no sítio de inserção infectado e na obstrução do cateter de nefrostomia.

Nesta oportunidade, o paciente do sexo masculino e de 73 anos, portador de carcinoma urotelial invasivo, desenvolveu nefropatia obstrutiva e necessitou de nefrostomia percutânea. Foi documentada infecção septicêmica e obstrução do cateter com isolamento de *C. diphtheriae*. A cepa foi denominada BR-CAT5003748, após ser identificada com padrão numérico 1010324 pelo sistema de galeria do API-Coryne e identificada como *C. diphtheriae*

subsp. *mitis* com 95,9% de probabilidade ($p= 0,99$). O resultado do PCR multiplex com “primer” para detecção do gene *tox* foi negativo. O micro-organismo apresentou susceptibilidade a ampicilina, cefepima, ceftriaxona, eritromicina, imipeném, vancomicina, cefazolina, gentamicina e penicilina G e resistente a oxacilina, ciprofloxacina e ceftazidima. Essa cepa estava associada a outra cepa de espécie Gram-positiva potencialmente patogênica: *Streptococcus agalactiae* (SGB). Uma revisão da literatura indicou que infecções polimicrobianas ocorreram em 15 % dos pacientes imunocomprometidos com câncer (Elting *et al.*, 1986; Rolston *et al.*, 2007). Comparada as infecções monomicrobianas, as infecções polimicrobianas, tanto em pacientes neutropênicos quanto em pacientes não-neutropênicos estão associadas com maiores morbidez e mortalidade. Há poucas informações sobre o espectro e a microbiologia dessas infecções, especialmente para as infecções polimicrobianas. Para pacientes com câncer, os potenciais agentes patogênicos são a própria microbiota humana, além de micro-organismos oportunistas emergentes e reemergentes estarem em ascensão. A precisão do diagnóstico microbiológico não é bem definido pela falta de distinção clara entre colonização e infecção (Klastersky & Aoun, 2004).

Muitos laboratórios não processam amostras para cultura de urina espontânea ou por cateterismo, de drenos de coleções intra-abdominais e pélvicas, ou de feridas cirúrgicas supuradas quando estão presentes vários micro-organismos. Nesses casos, os resultados microbiológicos são simplesmente relatados como “flora normal” ou como “amostras contaminadas”. Em pacientes com câncer, infecções polimicrobianas ocorrem em 25% dos casos (Hughes *et al.*, 1996), incluindo espécies de *Corynebacterium* (Martins, 2008). Portanto, a capacidade de virulência desse gênero, não deve ser subestimada, particularmente em pacientes de alto risco (Klastersky & Aoun, 2004; Oudiz *et al.*, 2004). São frequentes os casos de infecções relacionadas à cateter, provocadas por corinebactérias não-diftéricas, tratadas com sucesso apenas com terapia antimicrobiana, sem a remoção do cateter (Wang *et al.*, 2001;. Dobler & Braveny, 2003; Oudiz *et al.*, 2004; Schiff *et al.*, 2004;. Lee *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007; Dalal & Likhi, 2008). Essa conduta, entretanto, não é universalmente aceita para espécies multirresistentes e situações clínicas que envolvam instabilidade hemodinâmica.

Em contraste com a maioria dos casos de infecções relacionadas ao cateter causadas por corinebactérias não-diftéricas, no caso apresentado, a remoção do cateter foi obrigatória. O isolamento de *C. diphtheriae* não-toxigênico e associado ao SGB no ostium do cateter de nefrostomia percutânea que mostrava evidências de que ambos os micro-organismos podiam estar agindo sinergicamente na infecção relacionada ao cateter. A infecção por *S. agalactiae*

causa substancial morbidade e mortalidade em adultos, particularmente em idosos (acima da sétima década), pessoas com doenças de base importantes, como câncer, aqueles com história prévia de infecções recorrentes do trato urinário ou com um cateter urinário de demora. A infecção urinária invasiva por SGB tem sido diagnosticada clinicamente em 39% dos adultos com idade superior a 70 anos. O SGB tem sido associado à infecção de cateteres intravenosos, cateteres arteriais e marca-passo cardíaco (Farley, 2001).

No entanto, a co-infecção com *S. aureus* é comum em pacientes que têm uma infecção por SGB, que está associada com a presença de um dispositivo intravascular (Farley, 2001). Uma vez que o SGB foi isolado a partir do local de inserção do cateter, e a partir da urina do paciente, o papel patogênico de SGB é provável. Enquanto menores contagens bacterianas no local da inserção do cateter sugerem mais provavelmente colonização do que infecção, essa possibilidade não pode ser excluída, particularmente entre os pacientes imunocomprometidos. A busca por fatores de virulência presente na cepa *C. diphtheriae* BRCAT5003748 e que poderiam ter efetivamente contribuído para o estabelecimento da ocorrência de infecção relacionada ao cateter foi pesquisada. A formação do biofilme é um mecanismo patogênico conhecido de infecções relacionadas a dispositivos invasivos no ambiente hospitalar (Stewart & Costerton, 2001). Algumas bactérias, incluindo espécies de corinebactérias não-diftéricas (Marrie & Costerton, 1984; Soriano *et al.*, 1993; Soriano *et al.*, 2008;. Olson *et al.*, 2002;. Kwaszewska *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007), têm uma natural tendência a aderir às superfícies de dispositivos bióticos e/ou abióticos e com capacidade de formar biofilmes. A biologia da formação dos biofilmes pode ser caracterizada em três etapas: a aderência, a formação de microcolonias e desprendimento (O'Toole *et al.*, 2000). Os achados da literatura indicam que duas propriedades são frequentemente associados com bactérias produtoras de biofilme, a saber, o aumento da síntese de exopolissacarídeos e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos (Costerton *et al.*, 1999;. Olson *et al.*, 2002;. Rao *et al.*, 2008).

A presença de exopolissacarídeos em torno de bactérias em amostras clínicas foi observada estar associada com infecções sintomáticas do cateter. Outros fatores, tais como a presença de traços de metais (Aranha *et al.*, 1982) e de hidrofobicidade (Rosenberg, 1981) também podem ser importantes em tais interações. Pouco se sabe sobre a formação de biofilme por *C. diphtheriae*. Em estudos preliminares, diferentes níveis de aderência a superfície de vidro, foram observadas entre cepas de *C. diphtheriae*. A maioria das cepas (71%), que exibiram menor atividade hemaglutinante foi predominantemente eficaz em aderir às superfícies de vidro (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991). As propriedades bacterianas auto-agregantes em meio líquido e hidrofobicidade também foram observadas entre cepas de *C.*

diphtheriae (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999b). As cepas de *C. diphtheriae* testadas foram capazes de aderir à superfície de plástico carregado negativamente (poliestireno) como foi recentemente observado com *Corynebacterium urealyticum* (Soriano *et al.*, 2008). Para corinebactérias lipofílicas da pele, a auto-agregação em meios líquidos e hidrofobicidade foram estatisticamente relacionadas com a formação de biofilmes em superfícies sólidas (Kwaszewska *et al.*, 2006). Para cepas de *C. diphtheriae*, a auto-agregação em meios líquidos e a hidrofobicidade foram associadas com a formação de biofilmes em superfícies de poliestireno, mas não com a formação de biofilmes em superfícies de vidro carregadas positivamente (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991). Os depósitos de substâncias amorfas ou glicocálix foram vistos cobrindo células de *C. diphtheriae* (Moreira *et al.*, 2003). Estudos prévios indicaram a presença de exopolissacarídeos na superfície de células de *C. diphtheriae* (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999a), que também podem ser produzidas por micro-organismos, como os estafilococos coagulase-negativos (Christensen *et al.*, 1982; Christensen *et al.*, 1983) e *Pseudomonas aeruginosa* (Chan *et al.*, 1984). As cepas de *C. diphtheriae* exibiram ligantes de sacarídeos de superfície tais como a N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactose, manose símile e de resíduos de ácido siálico, mas estes em diferentes concentrações. As regiões ricas em ácido siálico contribuem para criar uma carga negativa sobre a superfície das células. A presença de uma porção exposta de ácido siálico foi predominantemente observada em *C. diphtheriae* aderente em superfície de vidro (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999b). Além disso, cepas de *C. diphtheriae* pareciam suportar o estresse oxidativo ambiental, em parte devido à sua capacidade de formação de biofilme (Silva De Souza *et al.*, 2003). A expressão de exopolissacarídeos nas células bacterianas e a capacidade de aderir a superfícies de vidro foram drasticamente reduzidas quando as cepas de *C. diphtheriae* foram submetidas a crescimento sob condições de limitação de ferro (Moreira *et al.*, 2003). Para *C. diphtheriae*, os mecanismos pelos quais ocorre a colonização bacteriana em cateteres têm ainda que ser melhor definidos. Os estudos destacados acima examinaram os fatores que podem estar relacionados a este fenômeno. Como outras linhagens de *C. diphtheriae*, a cepa não toxigênica BR-CAT5003748 foi fracamente hidrofóbica e incapaz de auto-agregar-se em meios líquidos, mas foi capaz de aderir a superfícies de poliestireno e de vidro. Quando segmentos de cateteres de poliuretano foram colonizados experimentalmente “in vitro” pelo *C. diphtheriae* cepa BR-CAT5003748, uma grande quantidade de biofilme foi produzida. Para as cepas de *S. epidermidis*, usadas como controle positivo, em algumas áreas, os cocos foram revestidos com “slime” semelhante ao ocorrido com *C. diphtheriae*. Da mesma forma, para *C. diphtheriae*, células bacterianas revestidas com “slime” (condensado de

glicocálice) também foram observadas na superfície de poliuretano. A avaliação da adesão e viabilidade de micro-organismos nos segmentos do cateter de poliuretano demonstrou que células viáveis de *C. diphtheriae* não-toxinogênico BR-CAT5003748 aderiram intensamente e se multiplicaram na superfície dos cateteres de poliuretano. Foi documentada a formação de microcolônias no lúmen do cateter e sobre uma superfície de vidro. Os depósitos amorfos e micro-organismos revestidos por “slime” foram observados na superfície de poliuretano, mas não sobre a de vidro. Portanto, a cepa BR-CAT5003748 apresentou propriedades semelhantes às de outros agentes patogênicos humanos produtores de biofilmes. Em *Acinetobacter baumannii* (Rao *et al.*, 2008), observou-se a capacidade da cepa BR-CAT5003748 para aderir e formar microcolônias em superfícies de vidro. Tal como para as espécies de *Corynebacterium* não diftérica (Marrie & Costerton, 1984; Soriano *et al.*, 1993), células de *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 também apresentaram crescimento de microcolônias na superfície de poliuretano colonizadas “in vitro”. Diferentes materiais de cateteres têm diferentes afinidades para aderência bacteriana (Franson *et al.*, 1984). O poliuretano implantado subcutaneamente em ratos de laboratório foi acompanhado por uma infiltração de eritrócitos e subsequente hemólise, que possivelmente resultou a partir de uma carga positiva associada a esse plástico, atraindo as células carregadas negativamente (Rigdon, 1970). Neste estudo, *C. diphtheriae* produziu biofilme em ambas as superfícies tanto a externa quanto na luz dos cateteres de poliuretano. Semelhante ao observado em outros agentes patogênicos Gram-positivos, a natureza delicada das irregularidades da superfície desses cateteres, provavelmente, contribuiu para não capturar totalmente *C. diphtheriae* na superfície do cateter de poliuretano. De acordo com observações anteriores em superfícies de vidro (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991), a adesão de *C. diphtheriae* ao poliuretano pode ser parcialmente explicada por uma carga elétrica positiva associada com este polímero. Além disso, os depósitos de substâncias amorfas (ou glicocálice) observadas ao redor das microcolônias de *C. diphtheriae* na superfície dos cateteres de poliuretano sugerem que as bactérias podem produzir ou atrair substâncias que reforçam a sua ligação com superfícies inertes “in vitro”. A formação de biofilme é um fenômeno comum na patogênese da *E. coli* enteroagregativa (ECEA). Múltiplos genes associados com a formação de biofilme são regulados por *aggR*, um regulador global de virulência da ECEA (Mohamed *et al.*, 2007). A presença de padrões de aderência atípica tem sido associada a novas categorias de *E. coli* virulentas. O padrão semelhante à aderência localizada (LAL) é caracterizado pela presença de microcolônias menos compactas ou aglomerados de bactérias em poucas células observadas apenas em testes de incubação prolongados (6 h) (Scaletsky *et al.*, 1999). Cepas de *E. coli* isoladas de

pacientes imunocomprometidos podem expressar simultaneamente características dos três padrões de adesão (localizada, agregativa e difusa) (Polotsky *et al.*, 1997), enquanto que algumas cepas de *E. coli* não pertencentes a classes reconhecidas de *E. coli* diarreicogênicas podem apresentar-se semelhante a um padrão de agregativo misto (AAL / LAL) (Bouzari *et al.*, 1994). Diferentes graus de aderência a monocamadas de HEp-2 foram previamente observados para cepas de *C. diphtheriae* isoladas de garganta e de lesões de pele (Hirata *et al.*, 2004). Estudos prévios também indicaram um papel patogênico de agregação-aderência (AA) na doença invasiva por *C. diphtheriae* (Hirata *et al.*, 2008). Outros estudos sugeriram a capacidade de formação de biofilme entre as cepas de *C. diphtheriae* que expressam padrões de LAL (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Hirata *et al.*, 2004) e AAL (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998). No presente estudo, a formação de microcolônias (uma indicação da formação de biofilme) pela cepa BR-CAT5003748 foi observada na superfície das células epiteliais, bem como nas superfícies de poliuretano e de vidro. Os micro-organismos foram encontrados associados a áreas localizadas nas células HEp-2, formando microcolônias soltas, o que caracteriza um padrão de LAL. As células BR-CAT5003748 também aderiram à superfície de células epiteliais, no substrato de vidro, e uns com os outros com a formação de tijolo empilhado, mas sem a formação de favo de mel típico, que caracteriza um padrão de aderência AAL (Fig. 4). Para ECEA, este padrão de aderência AAL atípico foi nomeado tipo B (Wakimoto *et al.*, 2004). Portanto, a cepa BR-CAT5003748 expressando a capacidade de formação de biofilme na superfície dos cateteres de poliuretano mostrou características simultâneas de padrões de LAL e AAL para células HEp-2. Da mesma forma que em *E. coli*, a existência pode indicar um novo mecanismo de produção de doença por *C. diphtheriae*. A reação da coagulase resultou em deposição de fibrina (nível 2 +), por *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 com formação de uma película semelhante a uma grande pseudomembrana dentro do tubo de ensaio. A formação de película não foi observada para *S. aureus* (4 +) ou *S. epidermidis* (0) nas cepas de controle. As propriedades intrínsecas da superfície do cateter, as características da superfície bacteriana, ou talvez a camada de revestimento produzida pelo hospedeiro, podem desempenhar um papel na fixação bacteriana à superfície do cateter. Embora a produção de fibrina seja uma das principais defesas do hospedeiro contra a infecção, uma causa comum de falha é a obstrução do cateter por uma camada de fibrina. As pontas de cateteres podem mostrar depósitos compostos de fibrina e células ocluindo o lúmen. Além disso, o revestimento de fibrina, proteínas do plasma, plaquetas e outras substâncias em torno da superfície externa do cateter podem proporcionar um nicho propício à implantação bacteriana. É possível que a deposição de fibrina sobre o cateter pode ser

estimulado pela infecção subclínica (Franson *et al.*, 1984; Bousquet-Rouaud *et al.*, 1993.). Além disso, para o crescimento de bactérias e produção de biofilmes no interior do cateter, a deposição de fibrina da cepa de *C. diphtheriae* pode contribuir para o mau funcionamento do cateter. Os dados sugeriram que esta capacidade do *C. diphtheriae* pode ter contribuído para a obstrução do cateter e para o estabelecimento de ambos os agentes patogênicos no óstio da nefrostomia neste estudo. Em conclusão, os bacilos da difteria são capazes de aderir a cateteres e induzir infecções em hospedeiros susceptíveis. *C. diphtheriae* podem formar biofilmes em cateteres de poliuretano “in vivo”, possivelmente, por produção de um de biofilme aderente como foi visto em superfícies de poliuretano “in vitro”. Interessantemente, o teste da coagulase em tubo com soro de coelho, resultou na formação de uma fina camada de fibrina mesmo sendo a cepa não-produtora de toxina diftérica (cepa BR-CAT5003748).

CONCLUSÕES

- a) Para os pacientes com câncer atendidos no INCA – Rio de Janeiro, a maioria (84,7%) das infecções causadas por microrganismos do grupo de bacilos Gram-positivos irregulares teve com agente etiológico cepas pertencentes ao gênero *Corynebacterium*;
- b) Diferentes espécies do gênero *Corynebacterium*, principalmente *C. amycolatum*, *C. jeikeium* e *C. pseudodiphtheriticum* foram capazes de colonizar (14% dos casos) ou causar processos infecciosos (86% dos casos) de diversos tipos em pacientes com câncer atendidos no INCA;
- c) As amostras de corinebactérias associadas com quadros de infecção em pacientes com câncer foram predominantemente multirresistentes e apresentaram variados perfis de sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados. As espécies *C. amycolatum* e *C. pseudodiphtheriticum* mostraram-se capazes de adquirir resistência em internações prolongadas quando submetidas à pressão seletiva de antibióticos, principalmente aos antibióticos beta-lactâmicos;
- d) Na maioria das oportunidades (77,1%) os quadros de corinebacterioses foram observados em pacientes hospitalizados;
- e) O comportamento agressivo da neoplasia, o tempo de internação hospitalar e o uso de dispositivos intravasculares aumentaram o risco de infecção por *Corynebacterium sp*, inclusive nas bacteremias;
- f) Embora os tipos de neoplasias variassem na população em estudo, predominaram os pacientes portadores de tumores sólidos do tipo adulto e pacientes cirúrgicos;
- g) Os quadros de infecção causados por cepas multirresistentes de *C. amycolatum* que foram mais frequentemente observados incluíram: bacteremias, infecções do trato urinário, trato respiratório inferior, feridas cirúrgicas, lesões tumorais ulceradas e relacionadas a cateteres;
- h) Dentre as corinebactérias isoladas de pacientes com câncer, as espécies multirresistentes *C. amycolatum* e *Corynebacterium jeikeium* exibiram maior potencial invasor uma vez que foram as principais responsáveis pelos quadros de bacteremias;
- i) Os quadros de bacteremias foram mais observados em pacientes que utilizavam cateteres venosos centrais (CVC) e que apresentavam tumores sólidos, doenças

linfoproliferativas e neutropenia. Enquanto infecções causadas por *C. amycolatum* e outras espécies acometeram principalmente pacientes com tumores sólidos, a infecção por *C. jeikeium* ocorreu principalmente em pacientes neutropênicos que usaram cateteres venosos;

j) O tratamento com vancomicina após a remoção do cateter mostrou-se eficaz para os pacientes com quadros de bacteremia;

l) As principais mudanças clinico-epidemiológicas ocorridas do primeiro para o segundo período, foram a diminuição dos pacientes internados de 97,4% para 54,2% ($p < 0,001$) e do uso de cateteres venosos de 94,7% para 75,0% ($p = 0,02$). Entretanto no segundo período, houve um maior número de episódios febris (13,2% para 37,5%; $p = 0,03$) e hipotensão arterial.

m) Amostras de *C. diphtheriae* produtoras e não produtoras de toxina diftérica foram capazes de causar quadros atípicos, por vezes fatais, em pacientes com câncer (15,8 casos/100.000 admissões), incluindo pneumonia, artrite séptica e infecção do SNC; *C. diphtheriae* também que se mostrou capaz de causar infecções relacionadas ao uso de dispositivos invasivos em pacientes idosos e com câncer;

n) A capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas, além da habilidade de deposição de fibrina e aderência na superfície de células epiteliais, pareceu contribuir para a persistência de *C. diphtheriae* no sítio de inserção, produção de biofilme na superfície de poliuretano e obstrução de cateter de nefrostomia;

o) A diversidade de perfis PFGE entre as amostras de *C. diphtheriae* isoladas no INCA enfatizou a endemicidade do microrganismo em nosso ambiente. Propagação de um perfil de PFGE indicou a possibilidade de circulação de alguns clones bacterianos dentro do ambiente hospitalar;

p) Não foram observados quadros de endocardite causados por corinebactérias em pacientes com câncer do INCA durante o período de investigação. Do mesmo modo, não foram observados quadros de infecção causados pela espécie *C. ulcerans* nos pacientes com câncer, apesar dessa espécie ter sido anteriormente capaz de causar infecção em humanos e caracterizada como endêmica na região metropolitana do Rio de Janeiro;

q) As corinebacterioses, incluindo as infecções atípicas causadas pelo *C. diphtheriae* devem ser incluídas entre outras infecções/doenças que pacientes com câncer podem adquirir quando recebem cuidados de saúde e/ou durante a internação em uma

instituição de saúde (infecções associadas ao atendimento em saúde), inclusive em regiões metropolitanas de países em desenvolvimento, como o Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

- Altemeier A, Burke JF, Pruitt BA, Sandusky WR. Definitions and classifications of surgical infections. In: Altemeier WA, Ed. Manual on Control of Infection in Surgical Patients. Philadelphia, PA: JB Lippincott; 1993.
- Alterthun F. Fatores de virulência bacteriana. In: Veronesi. Focaccia R. Ed. Tratado de Infectologia. 3ª ed, São Paulo: Atheneu; 2005.
- Aranha H, Strachan RC, Arceneaux JEL, Byers BR. Effect of trace metals on growth of *Streptococcus mutans* in a teflon chemostat. Infect Immun. 1982;35:456–60.
- Baio PVP, Mota HF, Freitas AD, Gomes DLR, Ramos JN, Santanna LO, *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(1):23-9.
- Barreau C, Bimet F, Kiredjian M, Rouillon N, Bizet C. Comparative chemotaxonomic studies of mycolic acid-free coryneform bacteria of human origin. J Clin Microbiol. 1993;31(8):2085-90.
- Begg N, Balraj V. Diphtheria: are we ready for it? Arch Dis Child. 1995;73:570.
- Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J Clin Microbiol. 2012;50(10):3152–8.
- Bernard KA, Funke G. Genus *Corynebacterium*. In Whitman WB Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 5. The actinobacteria. New York, NY: Springer; 2012.
- Bernard KA, Munro C, Wiebe D Ongsansoy E. Characteristic of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. J Clin Microbiol. 2002;40:4375-81.
- Berner R, Pelz K, Wilhelm C, Funke A, Leititis JU, Brandis M. Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. J Clin Microbiol. 1997;35(4):1011-2.
- Bodey GP. Emerging antimicrobial-resistant pathogens in the immunocompromised host. Curr Opin Infect Dis. 1995;8:411-4.
- Bousquet-Rouaud R, Castex F, Costalat G, Bastide M, Hedon B, Bouanani M, *et al.* Factors involved in catheter obstruction during long-term peritoneal insulin infusion. Diabetes Care. 1993;16:801-5.
- Bouzari S, Jafari A, Farhoudi-Moghaddam AA, Shokouhi F, Parsi M. Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. J Med Microbiol. 1994;40:95–7.
- Bowler ICJ, Mandal BK, Schlecht, Riordan T. Diphtheria - the continuing hazard. Arch Dis Child. 1988;63:194-210.
- Brandenburg AH, van Belkum A, van Pelt C, Bruining HA, Mouton JW, Verbrugh HA. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. J Clin Microbiol. 1996;34(9):2089-94.

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do ministro. Portaria n° 196, de 24 de junho de 1983. Diário oficial da União, Brasília, 28 de junho de 1983. Seção I. Dispõe sobre o controle e de prevenção das infecções hospitalares.

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do ministro. Portaria n° 930, de 27 de agosto de 1992. Diário oficial da União, Brasília, 02 de setembro de 1992. Seção I. Expede normas, na forma de anexos, para o controle das infecções hospitalares.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer Unidade I Um breve histórico das infecções hospitalares. P3. I Curso de prevenção e controle das infecções hospitalares, 1998a.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer Unidade I Epidemiologia aplicada ao controle das infecções hospitalares. P4. I Curso de prevenção e controle de infecções hospitalares, 1998b.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância. Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília – DF, 2009.

Burke GJ, Malouf MA and Glanville AR. Opportunistic lung infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* after lung and heart transplantation. *Med J Aust.* 1997;166:362–4.

Burkovski A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol.* 2012; 2013:1-11, ID 935736.

Camello TC, Souza MC, Martins CA, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, *et al.* *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48(4):458-64. Epub 2009 Feb 18.

Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Non-diphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Microbiol.* 2003;34(1):39-44.

Cantarelli VV, Brodt TCZ, Secchi C, Inamine E, Pereira FS, Pilger DA. Fatal case of bacteremia caused by an atypical strain of *Corynebacterium mucifaciens*. *Brazilian J Infect Dis.* 2006;10(6):416-8.

Cavendish J, Cole JB, Ohl CA. Polymicrobial central venous catheter sepsis involving a multiantibiotic-resistant strain of *Corynebacterium minutissimum*. *Clin Infect Dis.* 1994;19:204–5.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Division of High-Consequence Pathogens and Pathology (DHCPP). Nocardiosis. Last up date 2013. Acessado em 09 fev 2014

Chan R, Lam JS, Lam K, Costerton JW. Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1984;19:8–16.

Chiner E, Arriero JM, Signes-Costa J, Marco J, Corral J, Gomez-Esparrago A, et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunocompetent patient. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1999;54:325–7.

Chiu YL, Wu VC, Wun KD, Hsueh PR. Recurrent peritonitis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol*. 2005;63(3):241-2.

Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA, Beachey EH. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. 1983;18:258–69.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*. 1982;37:318–26. Cimolai N, Rogers P, Seear M. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonitis in a leukaemic child. *Thorax*. 1992;47:838–9.

Clarke R, Qamruddin A, Taylor M, Panigrahi H. Septic arthritis caused by *Corynebacterium amycolatum* following vascular graft sepsis. *J Infect*. 1999;38(2):126-7.

Clarridge JE, and Spiegel CA. *Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*. In Murray P.R. Ed in Chief, Barron EL, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. Eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed, Washington, DC: ASM Press; 1995.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*. M45-A, CLSI, Wayne, Pen; 2007. 15 pp.

Collins MD, Burton RA, Jones D. *Corynebacterium amycolatum* sp nov., a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol Lett*. 1988;49:349-52.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.

Coyle MB, Lipsky BA. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(3):227-46.

Dalal A, Likhi R. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. *J Infect*. 2008;56:77–9.

Daniels C, Schoors D, Van Camp G. Native valve endocarditis with aorta-to-left atrial fistula due to *Corynebacterium amycolatum*. *Eur J Echocardiogr*. 2003;4(1):68-70.

Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):847-67. Review.

David MZ, Crawford SE, Boyle-Vavra S, Hostetler MA, Kim DC, Daum RS. Contrasting pediatric and adult methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(4):631-7.

de Miguel I, Rodriguez E, Martin AM. *Corynebacterium amycolatum*: sepsis in hematologic patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999;17:340-1.

Dittmann S. Epidemic diphtheria in the newly independent states of the former USSR-situation and lessons learned. *Biologicals*. 1997;25:179-86.

Dobler G, Braveny I. Highly resistant *Corynebacterium macginleyi* as cause of intravenous catheter-related infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22:72-3.

Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:277-81.

Donowitz GR, Maki DG, Cornich CJ, Pappas PG, Rolston PVI. Infection in the neutropenic patient – new views of an old problem. In *Hematology Am Soc Hemato Educ Program*. 2001;113-39.

Eickhoff TC. Antibiotic and nosocomial infection. In: Bennett JV, Brackman PS Ed. *Hospital Infections*. 2^a Ed, Boston-Toronto: Little, Brown; 1986.

Elting LS, Bodey GP, Fainstein V. Polymicrobial septicemia in the cancer patient. *Medicine*. 1986;65(4):218-25.

Elting LS, Rubenstein EB, Rolston KVI, Bodey GP. Outcomes of bacteremia in patients with cancer and neutropenia: observations from two decades of epidemiological and clinical trials. *Clin Infect Dis*. 1997;25:247-59.

Emori TG, Culver DH, Horan TC, Jarvis WR, White JW, Olson DR, et al. National nosocomial infections surveillance system (NNIS): description of surveillance methods. *Am J Infect Control*. 1991;19(1):19-35.

Esteban J, Nieto E, Calvo R, Fernandez-Robals R, Valero-Guillen PL, Soriano F. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18(7):518-21.

Farley MM. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis*. 2001;33:556-61.

Fekete T. *Bacillus* species and related genera other than *Bacillus anthracis*. In: Mandell GL, Dolin R, Bennett JE. Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7^a ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.

Fernandes AT, Ribeiro Fo N. Infecção hospitalar: desequilíbrio ecológico na interação do homem com sua microbiota. In *Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde*. A. T. Fernandes Ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 2000.

Fernandez-Hidalgo N, Almirante B, Calleja R, Ruiz I, Planes AM, Rodriguez D, et al. Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(6):1172-80.

Ferraz EM, Bacelar TS, Aguiar JL, Ferraz AA, Pagnossin G, Batista JE. Wound infection rates in clean surgery: a potentially misleading risk classification. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1992;13(8):455-6.

Franson TR, Sheth NK, Rose HD, Sohnle PG. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J Clin Microbiol.* 1984;20:500-5.

Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et al. Active bacterial core surveillance program of the emerging infections program network. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med.* 2005;352(14):1436-44. Erratum in: *N Engl J Med.* 2005;352(22):2362.

Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 2002;137(10):791-7.

Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods In Murray P R. Ed. in Chief, Barron EL, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 9^a Ed. Washington, USA: ASM Press, 2007.

Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods, In Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of clinical microbiology,* 10^a ed, vol 1. Washington, DC: ASM Press; 2011.

Funke G, Punter V, von Graevenitz A. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(12):2874-8.

Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(1):125-59.

Funke G. Algorithm for identification of aerobic Gram-positive rods In Murray P R. Ed. in Chief, Barron E.L., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. Eds.. *Manual of Clinical Microbiology.* 9^a Ed. Washington, USA: ASM Press, 2007.

Gao B, Gupta RS. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76(1):66-112.

Garner IS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes IM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control.* 1988;16:128-40.

Gaynes R. Health care--associated bloodstream infections: a change in thinking. *Ann Intern Med.* 2002;137(10):850-1.

Gomes DLR, Martins CAS, Santos LS, Santos CS, Sabbadini P, Alves GB, et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related

infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J. Med Microbiol.* 2009;58(11):1419-27.

Gómez-Garcés JL, Alos JI, Tamayo J. In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(6):688-92.

Gonzalez-Barca E, Fernandez-Sevilla A, Carratala J, Gudiol F. Prospective study of 288 episodes of bacteremia in neutropenic cancer patients in a single institution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:291-6.

Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG, Munn VP, et al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infection in US hospitals. *Am J Epidemiol.* 1985a;121(2):182-205.

Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG. The nationwide nosocomial infection rate. A new need for vital statistics. *Am J Epidemiol.* 1985b;121:159-67.

Haley RW, Quade D, Freeman HE, Bennett JV. The SENIC Project. Study on the efficacy of nosocomial infection control (SENIC Project). Summary of study design. *Am J Epidemiol.* 1980;111(5):472-85.

Halker E, Wey SB., Infecção hospitalar da corrente sanguínea. In: Veronesi. Focaccia R. Ed. *Tratado de Infectologia.* São Paulo: Atheneu; 1996.

Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DLR, Damasco PV, Rosa ACP, et al. Potential pathogenic role of aggregative adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41:986–91.

Hirata Jr R, Souza SM, Rocha-de-Souza CM, Andrade AF, Monteiro-Leal LH, Formiga LC, Mattos-Guaraldi AL. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microb.Pathog.* 2004;36:125-30.

Hofer E, Reis CMF, Hofer CR. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(1):32-7.

Hollis DG, Wever RE. Gram-positive organisms: a guide to identification. Special Bacteriology Section, CDC, Atlanta, Georgia, 1981.

Hollis DG. Potential new CDC coryneform groups. Special Bacteriology Section. 1992, CDC, Atlanta, GA.

Holmes RK, Diphtheria and other corynebacterial infections. In: Harrison's. Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Eds. *Principles of Internal Medicine.* 16^a.Ed, McGraw-Hill Medical; 2005.

Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1): 99–139.

Howe RA, Brown NM, Spencer RC. The new threats of Gram-positive pathogens: re-emergence of things past. *J Clin Pathol*. 1996;49:444-9.

Hughes JM. Study on the efficacy of nosocomial infection control (SENIC Project): results and implications for the future. *Chemotherapy*. 1988;34(6):553-61.

Hughes WT, Flynn PM, Williams BG. Nosocomial infection in patients with neoplastic diseases. In Mayall CG Ed. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1996.

Izurieta HS, Strebel PM, Youngblood T, Hollis DG, Popovic T. Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, a new challenge in the differential diagnosis of diphtheria. *Emerg Infect Dis*. 1997;3:65-8.

Khamis A, Raoult D, La Scola B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1934-6.

Khamis A, Raoult D, La Scola B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3925-31.

Klustersky J. Science and pragmatism in the treatment and prevention of neutropenic infection. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41: Suppl. D, 13-24.

Klustersky J, Aoun M. Opportunistic infections in patients with cancer. *Ann Oncol*. 2004;15 Suppl 4:iv329-35. Review.

Knox KL, Holmes AH. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other non-diphtheriae corynebacteria. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(1):97-9.

Koll BS, Brown AE. The changing epidemiology of infections at cancer hospitals. *Clin Infect Dis*. 1993;suppl 2:S322-8.

Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Washington jr C.W. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5^a ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Ravens Publishers, 1997.

Kwaszewska AK, Brewczyńska A, Szewczyk EM. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. *Pol J Microbiol*. 2006;55(3):189-93.

La Force FM. The control of infections in hospitals: 1750-1950. In: Wenzel PR. Ed. *Prevention and Control of Nosocomial Infections*. 3^a ed, Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins;1997.

Lagrou K, Verhaegen J, Janssens M, Wauters G, Verbist L. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;30(1):7-15.

- Lai S, Efstratiou A. European laboratory working group on diphtheria. Report on the Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Brussels, Belgium. *Euro Surveill.* 2002;7(1):7-12.
- Lee CC, Lin WJ, Shih HI, Wu CJ, Chen PL, Lee HC, Lee NY, Chang CM, Wang LR, Ko WC, et al. Clinical significance of potential contaminants in blood cultures among patients in a medical center. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007;40(5):438-44.
- Lee PP, Ferguson DA Jr, Sarubbi FA. *Corynebacterium striatum*: an underappreciated community and nosocomial pathogen. *J Infect.* 2005;50:338-43.
- Lehmann JF. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1^a ed, München, 1896. <http://species.wikimedia.org/wiki/corynebacterium>.
- Lopes HV. Antibióticos e antibioticoterapia. In Veronesi, Focaccia R. Ed. Tratado de Infectologia. 3^a Ed, São Paulo, ed Atheneu, 2005.
- Lorber B., *Listeria monocytogenes*. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7^a ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.
- Lourenço-de-Oliveira R. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008 – editorial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008;103(7):627-8.
- Luna EJA. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2002;5(3):229-43.
- MacGregor RR., *Corynebacterium diphtheriae*. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.
- Mahe A. Bacterial skin infections in a tropical environment. *Curr Opin Infect Dis.* 2001;14(2):123-6.
- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous catheter-related infection. *N Engl J Méd.* 1977;296:1305-9.
- Marrie TJ, Costerton JW. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intra-arterial catheters. *J Clin Microbiol.* 1984;19:687-93.
- Martin C. Antimicrobial prophylaxis in surgery: general concepts and clinical guidelines. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1994;15:463-71.
- Martinez-Martinez L, Ortega MC, Suarez AI. Comparison of E-test with broth micro-dilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1318-21.

Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E, Hirata Jr R, et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five years study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:905-13.

Martins, CAS. Caracterização microbiológica e clínico-epidemiológica de corinebactérias em pacientes com câncer: um estudo de 5 anos. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração: Microbiologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro; 2008.

Mattos-Guaraldi AL, Camello TCF. Resistência Antimicrobiana em Micro-organismos associados a infecções oportunistas: Corinebactérias de importância médica. II Simpósio de Resistência aos Antimicrobianos. Mesa Redonda (16/06/2003), Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003.

Mattos-Guaraldi AL, Cappelli EA, Previato JO, Formiga LC, Andrade AF. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. FEMS Microbiol Lett. 1999a Jan 1;170(1):159-66.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Andrade AF. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. Curr Microbiol. 1999bJan;38(1):37-42.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Camello TCF, Pereira GA, Hirata R Jr, Halpern M. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. Rev Argentina de Microbiol 2001;33(2):96-100.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. Curr Microbiol. 1998;37:156-8.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. Braz J Med Biol Res. 1991;24:399-406.

Medeiros EAS, Pereira CAP, Wey SB. Introdução e histórico das infecções relacionadas à assistência à saúde. In: Veronesi. Focaccia R. Ed. Tratado de Infectologia. 3a ed, São Paulo: Atheneu, 2005.

Mendes NF, Mendes MC. Mecanismos imunes de defesa. In: Veronesi. Focaccia R. Ed. Tratado de Infectologia. 3ª ed, São Paulo: Atheneu, 2005.

Meyer DK, Reboli AC. Other Coryneform Bacteria and Rhodococci. In: Mandell GL, Dolin R, Bennett JE. Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.

Moellering jr RC, Eliopoulos GM. Anti-infective therapy. In: Mandell GL, Dolin R, Bennett JE. Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ª ed, New York: Churchill-Livingstone; 2009.

Mohamed JA, Huang DB, Jiang ZD, DuPont HL, Nataro JP, Belkind-Gerson J, Okhuysen PC. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J Clin Microbiol.* 2007;45:121-6.

Moreira LO, Andrade AF, Vale MD, Souza SM, Hirata Jr R, Asad LM, Asad NR, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Mattos-Guaraldi AL. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69:5907-13.

Nathan AW, Turner DR, Aubrey C, Cameron JS, Williams DG, Ogg CS. *Corynebacterium hofmannii* infection after renal transplantation. *Clin Nephrol.* 1982;17:315-8.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79.

Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002;66:86-92.

Ortiz-Pérez A, Martín-de-Hijas NZ, Esteban J, Fernández-Natal MI, García-Cía JJ, Fernández-Roblas R. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microbial Drug Resist.* 2010;16:273-7.

Osterwalder B, Frei R, Gratwohl A, Reber H, Speck B. Antibiotic-resistant corynebacteria-a new problem of infection in immunosuppressed patients. *Schweiz Med Wochenschr.* 1986;116:880-4.

Oteo J, Aracil B, Alós JJ, Gómez-Garcés. Bacteriemias significativas por *Corynebacterium amycolatum*: un patógeno emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001;19(3):103-6.

Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Ezaki T, Kimura S. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54:109-14.

Oudiz RJ, Widlitz A, Beckmann XJ, Camanga D, Alfie J, Brundage BH, Barst RJ. *Micrococcus*-associated central venous catheter infection in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2004;126:90-4.

Palacios L, Vela AI, Molin K, Fernández A, Latre MV, Chacón G, et al. Characterization of Some Bacterial Strains Isolated from Animal Clinical Materials and Identified as *Corynebacterium xerosis* by Molecular Biological Techniques. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3138-45.

Pfaller MA, Cormican MG. Microbiology: The role of the clinical laboratory. In: Wenzel PR. Ed. *Prevention and Control of Nosocomial Infections.* 3^a ed, Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins;1997.

Pittet D, Tarara D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infection in critical ill patients. JAMA. 1994;271:1598-601.

Pittet D. Nosocomial bloodstream infections In: Wenzel PR. Ed. Prevention and Control of Nosocomial Infections. 3rd ed, Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins;1997.

Pizzo PA. The changing face of febrile neutropenia—from monotherapy to moulds to mucositis. Where do we go from here? J Antimicrob Chemother. 2009;63 Suppl 1:i16-7. Review.

Polotsky Y, Nataro JP, Kotler D, Barrett TJ, Orenstein JM. HEp-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea. J Clin Microbiol. 1997;35:1952-8.

Quick ML, Sutter RW, Kobaidze K, Malakmadze N, Nakashidze R, Murvanidze S, et al. Risk factors for diphtheria: a prospective case-control study in the Republic of Georgia, 1995-1996. J Infect Dis. 2000;181 Suppl 1:S121-9.

Rampini MP, Ferreira EMS, Ferreira CG, Antunes HS. Low-power laser therapy in the prevention of induced oral mucositis: literature review. Revista Brasileira de Cancerologia. 2009;55:59-68.

Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Microbiol. 2008;26:333-7.

Reddy BS, Chaudhury A, Kalawat U, Jayaprada R, Reddy GSK, Ramana BV. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial Corynebacteria (Diphtheroids). Indian J of Medical Microbiol. 2012;30(1):52-7.

Riegel P. Bacteriological and clinical aspects of *Corynebacterium*. Ann Biol Clin. 1998;56(3):285-96.

Rigdon RH. Hemolysis associated with plastics - A histopathologic study with polyurethane. J Biomed Mater Res. 1970;4:57-71.

Rizvi M, Khan F, Raza A, Shukla I, Malik A, Rizvi SAR et al. Coryneformas the opportunistic pathogens – An emerging challenge for immunocompetent individuals. American-Eurasian J of Scientific Research. 2011;6(3):165-71.

Rizvi M, Rizvi MW, Shaheen, Sultan A, Khan F, Shukla I, et al. Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical site infections in a tertiary care hospital of North India. J Infect Public Health. 2013;6(4):283-8.

Rolston KV, Bodey GP, Safdar A. Polymicrobial infection in patients with cancer: an underappreciated and underreported entity. Clin Infect Dis. 2007;45(2):228-33. Review.

Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1625-9.

Rosenberg M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol.* 1981;42:375-7.

Rozdzinski E, Kern W, Schmeiser T, Kurrle E. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia at a tertiary care center. *Infection.* 1991;19:201-4.

Scaletsky ICA, Pedroso MZ, Oliva CAG, Carvalho RLB, Morais MB, Ulysses Fagundes-Neto U. A localized adherence-Like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 1999;67(7):3410-5.

Schiff H, Mücke C, Lang SM 2004. Exit-site infections by non-diphtheria corynebacteria in CAPD. *Perit Dial Int.* 2004;24:454-9.

Sierra JM, Martinez-Martinez L, Vazquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):1714-9.

Silva De Souza SM, Hirata Jr R, Moreira LO, Gomes ML, Braga De Andrade AF, Bernardo-Filho M, et al. Influence of stannous chloride on the adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Int J Mol Med.* 2003;12:657-61.

Sjödén B, Funke G, Izquierdo A, Akervall E, Collins MD. Description of some coryneform bacteria isolated from human clinical specimens as *Corynebacterium falsenii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48(1):69-74.

Soriano F, Huelves L, Naves P, Rodriguez-Cerrato V, Del Prado G, Ruiz V, et al. In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;63:353-6.

Soriano F, Ponte C, Ruiz P, Zapardiel J. Non-urinary tract infections caused by multiply antibiotic-resistant *Corynebacterium urealyticum*. *Clin Infect Dis.* 1993;17(5):890-1.

Soriano F, Zapardiel J, Nieto E. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:208-14.

Spencer RC. Epidemiology of infection in ICUs. *Intensive Care Med.* 1994;4 suppl:S2-6.

Stackebrandt E, Breyman S, Steiner U, Prauser H, Weiss N, Schumann P. Re-evaluation of the status of the genus *Oerskovia*, reclassification of *Promicromonospora enterophila* (Jäger et al. 1983) as *Oerskovia enterophila* comb. nov. and description of *Oerskovia jenensis* sp. nov. and *Oerskovia paurometabola* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1105-11.

Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, actino bacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997;47(2):479-91.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilm. *Lancet.* 2001;358(9276):135-8. Review.

Suzuki T, Lihara H, Uno T, Hara Y, Ohkusu K, Hata H, et al. Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3833-6.

Szmygin-Milanowska K, Kieszko R, Chudnicka A, Milanowski J. Microbial etiologies in community acquired pneumonia (CAP). *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska.* 2003;58:466-74.

Tang YW, Von Graevenitz A, Waddington MG, Hopkins MK, Smith DH, Li H, et al. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1676-8.

Teixido J, Arias N, Tarrats L, Romero R. The microbial pattern of the catheter exit-site infection in peritoneal dialysis: a nondiphtheria corynebacteria emergence? *Nefrologia.* 2007;27:350-8.

Telander B, Lerner R, Palmblad J, Ringertz O. *Corynebacterium* group JK in a hematological ward: infections, colonization and environmental contamination. *Scand J Infect Dis.* 1988;20(1):55-61.

Thuler LC, Velasco E, de Souza Martins CA, de Faria LM, da Fonseca NP, Dias LM, et al. An outbreak of *Bacillus* species in a cancer hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998;19(11): 856-8.

Torres HA, Reddy BT, Raad II, Tarrand J, Bodey GP, Hanna HA, et al. Nocardiosis in cancer patients. *Medicine.* 2002;81(5):388-97.

van der Lelie H, Leverstein-Van Hall M, Mertens M, van Zaanen HC, van Oers RH, Thomas BL, et al. *Corynebacterium* CDC group JK (*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. *Scand J Infect Dis.* 1995;27(6):581-4.

Vanechoutte M, De Bleser D, Claeys G, Verschraegen G, De Baere T, Hommez J, et al. Cardioverter-lead electrode infection due to *Corynebacterium amycolatum*. *Clin Infect Dis.* 1998;27(6):1553-4.

Vanechoutte M, Riegel P, de Briel D, Monteil H, Verschraegen G, De Rouck A, et al. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res Microbiol.* 1995;146:633-41.

Velasco E, Martins CA, Gonçalves VMSC, Dias LMC, Thuler LCS. Fatores de risco para o desenvolvimento de infecção da ferida operatória em cirurgia oncológica de cabeça e pescoço. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo.* 1992a;50(1):58-62.

Velasco E, Martins CA, Tabak D, Bouzas LF. *Bacillus subtilis* infection in a patient submitted to a bone marrow transplantation. Rev Paul Med. 1992b;110(3):116-7.

Velasco E, Thuler LCS, Martins CAS, Dias LMC, Gonçalves VMSC. Risk factors for infectious complications after abdominal surgery for malignant disease. Am J Infect Control 1996;24:1-6.

Velasco E, Thuler LCS, Martins CAS, Dias LMC, Gonçalves VMSC. Risk factors for bloodstream infections at a cancer center. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998a;17:587-90.

Velasco E, Thuler LCS, Martins CAS, Dias LMC, Gonçalves VMSC. Risk index for prediction of surgical site infection after oncology operations. Am J Infect Control. 1998b;26:217-23.

Velasco E, Thuler LCS, Martins CAS, Nucci M, Dias LMC, Gonçalves VMSC. Epidemiology of bloodstream infection at a cancer center. São Paulo Méd J/Rev Paul Méd. 2000;118:131-8.

Velasco E, Martins CA, Dias LM, Gonçalves VM. Nosocomial infections in an oncology intensive care unit. Am J Infect Control. 1997;25(6):458-62.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, et al. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71(3):495-548.

von Graevenitz A, Frommelt L, Punter-Streit V, Funke G. Diversity of coryneform found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures. Infection. 1998;26(1):36-8.

Wakimoto NJ, Nishi J, Sheikh J, Nataro JP, Tarantula J, Iwashita M, et al. Quantitative biofilm assay using a micro titer plate to screen for entero-aggregative *Escherichia coli*. Am J Trop Med Hyg. 71:687-90.

Wang CC, Mattson D, Wald A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. Bone Marrow Transplant. 2001;27:445-9.

Weinstein MP. Contaminated or not? Guidelines for interpretation of positive blood cultures. WebM&M. January 2008. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. <http://webmm.ahrq.gov/printviewcase.aspx?caseID=168>.

Wey SB, Darrigo LE. Infecções em unidades de terapia intensiva. In Veronesi R, Focaccia R. Eds. Tratado de Infectologia. São Paulo, SP: Ed Atheneu; 1996.

Widmer AF. Intravenous-related infections. In: Wenzel PR. Ed. Prevention and Control of Nosocomial Infections. 3^a Ed, Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1997.

Williams REO, Blowers R, Garrod LP, Shooter RA. Hospital infection. London, Lloyd-Luke (medical books); 1960.

Wilson APJ, Efstratiou A, Weaver E, Allason-Jones E, Bingham J, Ridgway GL, et al. Unusual non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in homosexual men. Lancet. 1992;339:998.

Wirsing von König CH, Finger H. The significance of "nonpathogenic" corynebacteria as a cause of opportunistic infections. Immun Infekt. 1986;14(5):178-82.

Wong ES. Surgical site infections. In: Mayall CG Ed. Hospital Epidemiology and Infection Control. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins; 1996.

Yamaguti A, Mendonça JS. Abordagem de pacientes neutropênicos febris. In: Veronesi. Focaccia R. Ed. Tratado de Infectologia. 3a ed, São Paulo: Atheneu; 2005.

Young VM, Meyers WF, Moody MR, Schimpff SC. The emergence of coryneform bacteria as a cause of nosocomial infections in compromised hosts. Am J Med. 1981;70(3):646-50.

Zalas P, Mikucka A, Gospodarek E. Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium amycolatum*. Med Dosw Mikrobiol. 2004;56(4):327-34.

Zembower T. Epidemiology of infectious complications in cancer patients. Cancer Treat Res. 1998;96:33-75.

Zinner SH. Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: emphasis on gram-positive and resistant bacteria. Clin Infect Dis. 1999;29(3):490-4.

ANEXO- Aprovação do Comitê de Ética



A(o): Dr. Carlos Alberto de Souza Martins
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 28 de outubro de 2011.

Registro CEP nº 64/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Aspectos clínico-epidemiológicos e microbiológicos de corinebacterioses em pacientes oncológicos e da virulência dos isolados de *Corynebacterium spp*

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou e aprovou o Relatório parcial datado de 13/9/11**, relacionado ao estudo acima, em sua reunião de 17 de outubro de 2011.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dr. Carlos Henrique D. Silva', is written over a horizontal line.

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA