Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Monica Cristina de Souza

Propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose celular de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

Rio de Janeiro

2013

Monica Cristina de Souza

Propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose celular de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

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.

Orientadora: Prof.ª Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior

Rio de Janeiro

2013

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

S716 Souza, Monica Cristina de.
Propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose celular de Corynebacterium pseudodiphtheriticum / Monica Cristina de Souza – 2013.
152 f. : il.

Orientador: Ana Luiza de Mattos Guaraldi.
Coorientador: Raphael Hirata Júnior.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Ciências Médicas.

1. Corynebacterium diphtheriae - Teses. 2. Fibrinogênio - Teses. 3. Fibronectinas - Teses. 4. Biofilme – Teses. 5. Apoptose - Teses. 6. Drogas - Resistência em microorganismos - Teses. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Hirata Júnior, Raphael. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.871.1

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

_____ _____
Assinatura Data

Monica Cristina de Souza

Propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose celular de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

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.

Aprovada em 20 de março de 2013.

Coorientador: 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.ª Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Fabrícia Pires Pimenta
Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof.ª Dra. Débora Leandro Rama Gomes
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maximiano (*in memorian*) e Edy, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência.

Ao meu esposo José Wallace e a minha filha Manuella pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena!

AGRADECIMENTOS

Na tese de mestrado, percebi que uma dissertação, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contribuições de várias pessoas. Volto a reiterar tal afirmação, com a certeza de que nunca foi tão verdadeira quanto agora.

Desde o início do doutoramento, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem aquelas colaborações, esta investigação não teria sido possível.

Agradeço a Deus por colocar todas estas pessoas no meu caminho.

A minha querida Prof.ª orientadora Ana Luíza de Mattos Guaraldi, meu imenso agradecimento, pela inestimável orientação, confiança, dedicação, amizade, carinho e ensinamentos, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Ainda lhe sou grata pelos feriados perdidos em prol da realização da etapa final deste trabalho.

Ao meu querido Prof. orientador Raphael Hirata Júnior, pela orientação, agradeço o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, obrigada por continuar a me acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

Aos coordenadores e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas e ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Nos seminários de doutoramento em Ciências Médicas oferecidos pelo PGCM, pude participar de um grupo de investigadores da área de Ciências Médicas, o que representou uma oportunidade ímpar de crescimento acadêmico e também pessoal. A todos, obrigada pela oportunidade de aprender e contribuir.

Aos vários docentes e profissionais da área de Ciências Médicas que prescindiram de algum do seu precioso tempo afim de colaborar com a realização deste estudo, em especial aos profissionais, docentes e alunos do Laboratório de Biologia Celular – Departamento de Biologia Celular /UERJ, meu muito obrigada.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, em especial a funcionária Maria Angélica Paiva da Silva pelo irrestrito auxílio prestado na cultura de células.

Sou muito grata a todos os meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos. A minha dedicada mãe Edy Justino de Souza pelo exemplo de vitalidade e energia, por todo amor e apoio em todas as fases da minha vida. Ao meu querido pai Maximiano

Eleotério de Souza, em memória, pelas provas de amor e incentivo em todos esses anos de estudo.

Ao meu esposo José Wallace dos Santos Silva, por todo o amor e pelo seu inestimável apoio que sempre me dedicou.

A minha filha Manuella Souza dos Santos Silva, pelo alento, refúgio e compreensão nos dias difíceis.

A todas minhas irmãs e em especial minha sobrinha Thaís Souza, pelo carinho demonstrado durante todos os momentos no decorrer do curso.

As amigas Alessandra Filardy, Cíntia Santos, Fabrícia Pimenta, Gabriela Andrade, Thereza Camello, Louisy Sanches, Isabela, Débora Rama, Fátima Napoleão, Priscila Sabbadini pelo apoio e carinho demonstrado nestes ótimos anos de convivência.

Aos queridos amigos do LDCIC Leonardo, Lincon, Higor, Cassius, Maurício, Yuri, Juliana, Liliane, Dilzamar, pelos bons momentos compartilhados.

A CAPES, CNPq, PRONEX, FAPERJ e SR2-UERJ pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

SOUZA, Monica Cristina de. **Propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose celular de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*.** 2013. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A ocorrência de fenótipos multirresistentes de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* e sua associação a infecções graves, com elevada mortalidade em pacientes imunocomprometidos, aliados ao escasso conhecimento da virulência e patogenia destas infecções, motivou esta pesquisa, que teve como objetivo investigar mecanismos de virulência e resistência microbiana deste agente entre pacientes de um hospital universitário brasileiro. Um total de 113 amostras de *C. pseudodiphtheriticum* identificadas por métodos bioquímicos convencionais e sistema API-Coryne isoladas de pacientes de diferentes grupos etários. Os micro-organismos eram, em sua maioria, relacionados a infecções no trato respiratório (27,45%), urinário (29,20%) e sitios intravenosos (18,60%) e cerca de 32,70% das amostras foram provenientes de pacientes com pelo menos uma das condições predisponentes: insuficiência renal; transplante renal, tuberculose em paciente HIV+, câncer, cirrose hepática, hemodiálise e uso de cateter. As amostras testadas revelaram-se multirresistentes sendo a maioria resistente à oxacilina, eritromicina e clindamicina. A adesão das cepas ao poliestireno e ao poliuretano indicou o envolvimento de hidrofobicidade da superfície celular na fase inicial da formação de biofilmes. O crescimento subsequente conduziu à formação de microcolônias, agregados bacterianos densos incorporados na matriz exopolimérica rodeada por espaços vazios, típica de biofilmes maduros. Adicionalmente, a interação do micro-organismo com fibrinogênio e fibronectina humana indica o envolvimento destes componentes séricos na formação de biofilme, sugerindo a participação de diferentes adesinas neste processo e a capacidade deste agente formar biofilme *in vivo*. A afinidade por esses componentes e a formação de biofilme podem contribuir para o estabelecimento e disseminação da infecção no hospedeiro. Adicionalmente, as cepas de *C. pseudodiphtheriticum* isoladas de pacientes com infecções localizadas (ATCC10700/Pharyngitis) e sistêmicas (HHC1507/Bacteremia) exibiram um padrão de aderência agregativa-like a células HEp-2, caracterizado por aglomerados de bactérias com aparência de um "empilhado de tijolos". Através do teste FAS e ensaios de interação na presença de inibidores de citoesqueleto, demonstramos o envolvimento da polimerização de actina na internalização das cepas testadas. A internalização bacteriana e rearranjo do citoesqueleto pareceu ser parcialmente desencadeado pela ativação da tirosina-quinase. Finalmente, *C. pseudodiphtheriticum* foi capaz de sobreviver no ambiente intracelular e embora não tenha demonstrado capacidade de replicar intracelularmente, células HEp-2 foram incapazes de eliminar o patógeno completamente no ambiente extracelular no período de 24 horas. Todas as cepas estudadas foram capazes de induzir apoptose em células epiteliais 24 horas pós-infecção evidenciada pelo aumento significativo no número de células mortas e pela ocorrência de alterações nucleares reveladas através dos métodos de coloração pelo azul Trypan, pelo DAPI e microscopia electrônica de transmissão. Alterações morfológicas incluindo a vacuolização, a fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos foram observadas neste período. A citometria de fluxo demonstrou ainda uma diminuição significativa no tamanho das células infectadas e a utilização de dupla marcação (iodeto de propídio / anexina V) permitiu a detecção da ocorrência de necrose e apoptose tardia. Em conclusão, o conhecimento de tais características contribuiu para a compreensão de mecanismos envolvidos no aumento da frequência de infecções graves com elevada mortalidade em pacientes no ambiente hospitalar, por *C. pseudodiphtheriticum*, um patógeno rotineiramente subestimado em países em desenvolvimento.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Multirresistência. HEp-2 cells. Agregativa. Internalização. Biofilme. Fibrinogênio. Fibronectina. Apoptose. Necrose.

ABSTRACT

SOUZA, Monica Cristina de. **Adhesive properties to abiotic and biotic substrates, invasion and induction of apoptosis of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum***. 2013. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The occurrence of multiresistant phenotypes and associated with severe infections, with high mortality in immunocompromised hosts due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, allied to little known about virulence and pathogenesis these infections, led to present investigation. The investigation aims to examine the virulence mechanisms and resistance to antimicrobial agents of *C. pseudodiphtheriticum* among patients with bacterial infections at a Brazilian teaching hospital. A total of 113 *C. pseudodiphtheriticum* strains identified by conventional biochemical methods and API-Coryne System were recovered from patients from different age groups. Micro-organisms were mostly related to infections in the respiratory tracts (27.45%), urinary (29.20%) and intravenous sites (18.60%) and approximately 32.70% samples were obtained of patients presenting at least one of the pre-disposing conditions: end-stage renal disease; renal transplant; AIDS and *Mycobacterium tuberculosis* infection; cancer, hepatic cirrhosis; haemodialysis and catheter use. Antimicrobial susceptibility tests identified multiresistant phenotypes. Most strains were resistant to oxacillin, erythromycin and clindamycin. Adherence to polystyrene and polyurethane indicated the involvement of cell surface hydrophobicity in the initial stage of biofilm formation. Further growth led to the formation of dense bacterial aggregates embedded in the exopolymeric matrix surrounded by voids, typical of mature biofilms. Data also showed *C. pseudodiphtheriticum* recognizing human fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) and involvement of these sera components in biofilm formation in "conditioning films". These findings suggest that biofilm formation may be associated with the expression of different adhesins. *C. pseudodiphtheriticum* may form biofilm *in vivo* possibly by an adherent biofilm mode of growth *in vitro* currently demonstrated on hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces. The affinity to Fbg and Fn and the biofilm-forming ability may contribute to the establishment and dissemination of infection caused by *C. pseudodiphtheriticum*. Additionally, *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from patients with localized (ATCC10700/Pharyngitis) and systemic (HHC1507/Bacteremia) infections exhibited an aggregative adherence-like pattern to HEp-2 cells characterized by clumps of bacteria with a "stacked-brick" appearance. The fluorescent actin staining test demonstrated that actin polymerization is involved in the internalization of the *C. pseudodiphtheriticum* strains. Bacterial internalization and cytoskeletal rearrangement seemed to be partially triggered by the activation of tyrosine kinase activity. Although *C. pseudodiphtheriticum* strains did not demonstrate an ability to replicate intracellularly, HEp-2 cells were unable to fully clear the pathogen within 24 hours. All samples were able to induce apoptosis in HEp-2 cells 24 h post-infection, evidenced by significant increase in the number of dead cells and nuclear alterations were observed by the Trypan blue assay, DAPI and transmission electron microscopy. Morphological changes in HEp-2 cells observed 24 h post-infection included vacuolization, nuclear fragmentation and the formation of apoptotic bodies. Flow cytometry revealed an significant decrease in cell size of infected HEp-2 cells. Furthermore, a double-staining assay using Propidium Iodide/Annexin V gave information about the numbers of vital vs. early apoptotic cells and late apoptotic or secondary necrotic cells. In conclusion, these characteristics may contribute to understanding of mechanisms involved on increase of severe infection, with high mortality in nosocomial enviroment patients by *C. pseudodiphtheriticum*, a pathogen usually overlooked in emerging countries.

Keywords: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum.* Multiresistance. HEp-2 cells. Aggregative. Internalization. Biofilm. Fibrinogen. Fibronectin. Apoptosis. Necrosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aderência Agregativa
AA	Aggregative Adherence
AAF	Aggregative Adherence Fimbriae
AA-Like	Aggregative-Like Adherence
Ac-Hly	Adenilato Ciclase Hemolisine
AD	Aderência Difusa
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AL	Aderência Localizada
Apaf 1	Apoptosis Protease Ativanting Fator 1
ATCC	*American Type Culture Collection*
AV	Anexina V
BAL	Bronchoalveolar Lavage
Bcl2	Proteínas pró apoptóticas
BEC	Célula de Mucosa Bucal de Humanos
BfpA	Bundle-forming pilus
BGPI	Bastonete Gram-positivo Irregular
BSA	Bovine Serum Albumin
CAB	Columbia Agar Base
CAP	Pneumonias Adquiridas na Comunidade
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CFU	Colony-Forming Unit
CLED	Cystine Lactose Electrolytes Deficient Agar
CLSI	National Comittee for Clinical Laboratories Standards

CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMN	*Coryebacterium-Mycobacterium-Nocardia*
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CyaA	Adenilato Ciclase
DA	Diffuse Adherence
EAEC	*Escherichia coli* Enteroagregativa
EPS	Exopolissacarídeos
EPS	Extracellular Polymeric Substances
FAS	Fluorescent Actin Staining
Fbg	Fibrinogênio
FCS	Foetal Calf Serum
FGF	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
FHA	Hemaglutinina Filamentosa
Fn	Fibronectina
FnBP	Fibronectin-Binding Proteins
FSC	Forward Scatter
HA	Haemagglutination
HEp-2	Células Epiteliais de Carcinoma de Laringe Humana
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC	Intracellular viable bacteria
IGPR	Irregular Gram-positive Rods
IL	Interleucina
ISBN	International Standard Book Number
LA	Localized Adherence

LBA	Lavado Broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz Extracelular
MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MOI	Multiplicity of Infection
MR	Multiresistance
MRS	Methicillin resistant *Staphylococcus spp*.
MRSA	Methicillin resistant *S. aureus*
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matriz Molecules
NICU	Neonatal Intensive Care Unit
OD	Optical Density
PBS	Phosphate-buffered Saline
PBS	Solução Salina Tamponada Fosfatada
PBSD	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline - Bovine Serum Albumin – Tween 20
PI	Propidium Iodide
PVC	Policloreto de Vinila
SD	Standard Deviation
SEM	Scanning Electron Micrographs
SERAM	Moléculas Adesivas Secretável de Repertório Expandido
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Side Scatter
TEM	Transmission Electron Microscopy
TNF	Tumoral Necrosis Factor

TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Yop	Proteína Externa de *Yersinia*

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	**CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ESPÉCIE *CORYNEBACTERIUM PSEUDODIPHTHERITICUM***	15
1.1	**Estudos do potencial patogênico de diferentes espécies de corinebactérias**	22
1.2	**Mobilização do citoesqueleto em resposta aos patógenos bacterianos**	24
1.3	**Participação de glicoproteínas de matriz extracelular nos processos de interação celular**.....	26
1.4	**Mecanismos de morte de células eucarióticas**	30
1.5	**Biofilmes Bacterianos**.....	33
1.5.1	Etapas do desenvolvimento de um biofilme.....	34
1.5.2	Infecções associadas a biofilmes bacterianos.....	36
1.5.3	Participação de glicoproteínas de matriz extracelular na formação de biofilme.....	37
2	**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**.....	38
2.1	**Objetivos específicos**.....	38
3	**RESULTADOS**.....	40
3.1	**Artigo 1 – *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries**.	41
3.2	**Artigo 2 - Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells**.....	49
3.3	**Artigo 3 - Biofilm formation and binding activities to fibrinogen and fibronectin by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum***.....	58
3.4	**Artigo 4 - Internalization of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* by epitelial cells induces apoptosis**.....	92
4	**DISCUSSÃO**.....	110
	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS	125
	ANEXO - Produção Científica Durante o Período de Realização do Doutorado.....	146

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas cuja incidência aumentou nas últimas décadas, ou tende a aumentar no futuro, são caracterizadas como doenças emergentes. Dentre as diferentes circunstâncias que podem melhor caracterizar a emergência de novos problemas de Saúde além do surgimento ou identificação de novos agentes etiológicos está incluído o crescimento de grupos populacionais expostos. Desde 1970, alguns autores começaram a relatar casos de infecções graves causadas por bastonetes Gram-positivos irregulares (BGPIs), também referidos como corineformes e/ou "difteróides" (Coyle & Lipsky, 1990). Desde aquela época, a maioria dos casos clínicos relatados já estava associada com quadros de bacteremia e endocardite em pacientes em estado de malignidade ou sob terapia com imunossupressores (Rikitomi *et al*., 1987; Morris & Guild, 1991; Manzella *et al*., 1995). O aumento do número de casos de infecções de origens diversas, algumas fatais, tem contribuído para aumentar o interesse pelos micro-organismos corineformes, particularmente as corinebactérias (Coyle & Lipsky, 1990; Marshall & Johnson, 1990; Riegel *et al*., 1996, Funke *et al*., 1997). Diversas espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, algumas integrantes da microbiota anfibiôntica normal humana, principalmente da pele e do trato respiratório superior, encontram-se bem estabelecidas como verdadeiros patógenos. Entretanto, em algumas oportunidades, é difícil a distinção entre colonização e infecção (Funke *et al*., 1997).

Considerando que muitos dos corineformes isolados de material clínico não são *Corynebacterium sp.* e ainda por causa das diferenças significativas em termos de patogenicidade, micro-organismos isolados de sítios normalmente estéreis e encontrados em grande número devem ser identificados ao nível de gênero. Em muitos laboratórios a relevância do isolamento de BGPIs não tem sido considerada, resultando em atraso na implementação de terapia adequada e conseqüente agravamento do quadro clínico do paciente infectado. O reconhecimento de infecções causadas por micro-organismos corineformes depende muito da habilidade dos laboratórios na identificação das espécies. Poucos são os laboratórios que dispõem de recursos materiais e profissionais qualificados para a caracterização fenotípica e/ou genotípica de BGPIs.

Os BGPIs compreendem um complexo grupo de bactérias aeróbicas, pleomórficas, imóveis e não formadoras de esporos, cuja reclassificação taxonômica permanece frequente (Coyle & Lipsky, 1990; Funke *et al*., 1997; Riegel, 1998). As frequentes modificações taxonômicas, aliadas ao crescente número de novas espécies incluídas no gênero

Corynebacterium dificultam a identificação dos BGPIs isolados de material clínico. Um dos obstáculos encontrados pelos microbiologistas quando frente às amostras de BGPIs é que aproximadamente 40% delas não pertencem ao gênero *Corynebacterium* (Coyle & Lipsky, 1990).

Nas últimas décadas, a despeito dos avanços da terapia antimicrobiana, a incidência de infecções causadas por micro-organismos multirresistentes vem aumentando e dificultando, principalmente, o tratamento de infecções nosocomiais. A ampla variabilidade no perfil de resistência aos antimicrobianos também vem sendo motivo de discussão em espécies do gênero *Corynebacterium* (Baquero, 1997). Embora tenham sido realizados estudos relativos aos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de amostras desse gênero, de diferentes espécies, potencialmente patogênicas para humanos, ainda não foi possível estabelecer critérios de padronização para confecção de testes de sensibilidade pelo CLSI (Clinical Laboratories Standards Institute) (Martinez-Maertínez *et al*., 1995).

Espécies diversas de *Corynebacterium*, até mesmo o *Corynebacterium diphtheriae* (Riegel, 1998), têm sido frequentemente relacionadas (60%) com casos de infecções nosocomiais (Coyle & Lipsky, 1990; Lagrou *et al*., 1998; Riegel, 1998; Janda, 1999; Camello *et al*., 2003; Camello *et al*., 2009). Dentre as várias espécies relacionadas com infecções humanas podemos incluir *C. xerosis, C. amycolatum, C. striatum, C. minutissimum, C. matruchotii, C. genitalium, C. pseudogenitalium e C. pseudodiphtheriticum.* As espécies *C. pseudotuberculosis, C. kutscheri e C. renale* normalmente são encontradas infectando animais e, raramente os humanos (Coyle & Lipsky, 1990; Riegel *et al*., 1996; Lagrou *et al*., 1998; Anderson *et al*., 2004; Braga *et al*., 2006; Pavan *et al*., 2012). Muitos desses micro-organismos já foram estabelecidos como verdadeiros patógenos humanos exibindo resistência múltipla aos antimicrobianos. Dentre as espécies isoladas de humanos a partir da década de 90 podemos incluir: *C. auris* (Funke *et al*., 1995; Babay & Kambal, 2004), *C. argentoratense* (Riegel *et al*., 1995), *C. durum* (Riegel *et al*., 1997), *C. imitans* (Funke *et al*., 1997a), *C. mucifaciens* (Funke *et al*., 1997b; Morinaka *et al*., 2006), *C. lipophiloflavum* (Funke *et al*., 1997c), *C. coyleae* (Funke *et al*., 1997; Taguchi *et al*., 2006), *C. riegelii* (Funke *et al*., 1998a; Van *et al*., 2006), *C. confusum* (Funke *et al*., 1998b), *C. falsenii* (Sjoden *et al*., 1998) *C. kroppenstedtii* (Collins *et al*., 1998; Riegel *et al*., 2004), *C. thomssenii* (Zimmermann *et al*., 1998) e *C. sundsvallense* (Collins *et al*., 1999).

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ESPÉCIE *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

No Brasil, escassos são os trabalhos voltados para a caracterização de corinebactérias em processos infecciosos humanos. No Rio de Janeiro, foi relatado o isolamento de corinebactérias a partir de espécimes clínicos diversos de pacientes atendidos em hospital universitário. *C. pseudodiphtheriticum, C. amycolatum, C. propinquum, C. minutissimum,* e *C. xerosis* foram encontradas predominantente (79%) entre as espécies de corinebactérias isoladas. As amostras de corinebactérias foram isoladas principalmente da urina e sítios intravenosos (cateteres e sangue) (46,20%), seguido das feridas cirúrgicas e/ou outros tipos de lesões cutâneas e abscessos (17,90%). A maioria das espécies foi isolada de amostras de urina. *C. amycolatum* > *C. minutissimum* > *C. pseudodiphtheriticum* foram as espécies predominantemente isoladas de urina; *C. minutissimum* > *C. propinquum* > *C. amycolatum* > *C. striatum* foram as espécies predominantemente isoladas de feridas cirúrgicas e/ou outros tipos de lesões cutâneas e abscessos; *C. xerosis* > *C. amycolatum* > *C. pseudodiphtheriticum* > *C. propinquum de sítios intravenosos; C. pseudodiphtheriticum* e *C. propinquum* do trato respiratório inferior; enquanto o *C. pseudodiphtheriticum* e *C. amycolatum* foram isolados de fluidos peritoneal e cerebroespinhal, respectivamente. Neste estudo, foi observado que o *C. pseudodiphtheriticum* foi a espécie de corinebactéria predominantemente isolada no ambiente hospitalar (20,24%) a partir de diferentes espécimes clínicos: urina (15%), feridas cirúrgicas e/ou outros tipos de lesões cutâneas e abscessos (10%), sítios intravenosos [cateteres (17%) e sangue (83%)] (21%), trato respiratório inferior (12%), líquido peritoneal (12%) além de outros (30%) espécimes clínicos. O micro-organismo foi isolado a partir de secreção do trato respiratório inferior e de líquido peritoneal de pacientes portadores do vírus HIV. Adicionalmente foram isoladas amostras multirresistentes de *C. pseudodiphtheriticum* a partir de urina, feridas cirúrgicas (Camello *et al*., 2003).

Pouco se conhece sobre os aspectos fenotípicos, genotípicos, epidemiológicos, além dos mecanismos de patogenicidade da espécie *C. pseudodiphtheriticum*.

C. pseudodiphtheriticum apresenta colônias com 1 a 2mm de diâmetro, com aspecto esbranquiçado, levemente secas, não hemolíticas e não lipofílicas em culturas de 72 horas formadas por micro-organismos que possuem capacidade de reduzir nitrato, hidrolizar uréia e, em algumas oportunidades, a tirosina e o hipurato e incapazes de produzir DNase, gelatinase e

fator CAMP e ácidos a partir dos carboidratos rotineiramente utilizados para diagnóstico convencional de BGPI's (Funke *et al.*, 1997).

Os processos infecciosos causados por *C. pseudodiphtheriticum* podem acometer indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (Colt *et al.*, 1991; Manzella *et al*., 1995; von Graevenitz *et al.*, 1998; Díez-Aguilar *et al*., 2012). Apesar de ser considerado como micro-organismo participante da microbiota anfibiôntica da pele e mucosas humanas, o *C. pseudodiphtheriticum* tem sido relatado cada vez mais como causa de doenças em humanos (Burke *et al*., 1997; Izurieta *et al.*, 1997, Martins *et al*., 2009; Cherkasov & Gladysheva, 2010; Morinaga *et al*., 2010; Gompelmann *et al*., 2011; Moyad, 2013; Erturan *et al*., 2012). A taxa de isolamento de espécies de *Corynebacterium* como microbiota normal pode ser relativamente mais alta no verão do que no inverno nos países de clima frios ou temperados (Rikitomi *et al*., 1989). Considerando o aumento da contribuição dessas espécies para a composição da microbiota normal do hospedeiro e os tipos de *Corynebacterium* e corineformes em infecções oportunísticas em pessoas, a investigação foi realizada a partir de amostras de diferentes sítios de isolamento de pacientes. Estudos prévios, que tratam da caracterização de bacilos Gram-positivos corineformes isolados de diversas fontes clínicas, demonstram que *Corynebacterium accolens*, *C. striatum*, *C. argentoratense*, *C. propinquum* e *C. pseudodiphtheriticum* foram principalmente isolados do trato respiratório, enquanto que *Corynebacterium afermentans*, CDC grupo G, e *Corynebacterium jeikeium* foram principalmente isolados de amostras de sangue (Riegel *et al*., 1996).

C. pseudodiphtheriticum é comumente encontrado na orofaringe de humanos (Miller *et al*., 1986). As pesquisas de bactérias corineformes isoladas de garganta de indivíduos saudáveis, em Hamburgo (Alemanha) e Zurique (Suíça), apresentaram as taxas de isolamento de 47% para *Corynebacterium durum* e 29% para *Rothia dentocariosa*, não tendo sido isolados *C. striatum*, *C. amycolatum*, ou *C. diphtheriae*. Curiosamente, *C. pseudodiphtheriticum* também foi isolado da microbiota do trato respiratório superior destes indivíduos (von Graevenitz *et al.*, 1998). Recentemente foi relatado que *C. pseudodiphtheriticum* foi o micro-organismo mais frequetemente isolado (63%) de infecções do trato respiratório superior, especialmente nas infecções adquiridas no ambiente hospitalar, após 2 anos de investigação desenvolvida em um Hospital Universitário da França (Nhan *et al*., 2012). *C. pseudodiphtheriticum* foi descrito como a espécie mais frequente e mais numerosa entre as bactérias difteróides encontradas na cavidade nasal de indivíduos sadios (Linoli *et al*., 1981).

Apesar da sua frequente presença na microbiota do trato respiratório superior, *C. pseudodiphtheriticum* tem sido raramente descrito como agente etiológico de infecções na garganta e nasofaringe, tais como, faringite exsudativa (Ellner, 1997; Izurieta *et al.*, 1997), rinossinusite subaguda (Voiriot *et al.*, 1986) e discite subseqüentes à cirurgia de ouvido, nariz e garganta (Wright *et al*., 1995). Foi relatado um caso de faringite exsudativa com formação de pseudomembrana possivelmente causada por *C. pseudodiphtheriticum* em uma menina de 4 anos de idade. A compreensão do papel da patogenicidade de *C. pseudodiphtheriticum* nos quadros de faringite é de importância para Saúde Pública (Izurieta *et al.*, 1997).

Foi descrito um caso de traqueíte necrotizante em um paciente do sexo masculino apresentando 54 anos de idade. A partir de tecidos traqueais foram isoladas amostras de *C. pseudodiphtheriticum* resistentes à eritromicina e clindamicina. O tratamento com penicilina intravenosa resultou na resolução do processo inflamatório e erradicação dos micro-organismos (Colt *et al.*, 1991). Também foi relatado um caso de traqueobronquite aguda supurativa devido à infecção por *C. pseudodiphtheriticum* (Ramos Rincon *et al*., 1998). Infecções respiratórias, especialmente formas de pneumonias comunitárias (CAP), são desafiantes para os clínicos porque: (1) o agente etiológico pode ser detectado somente em cerca de 50% dos casos; (2) a terapia inicial, portanto, tem de ser baseada no contexto etiológico provável ou mais provável da condição médica do paciente; e (3) novos micro-organismos ou aqueles considerados previamente, assim como os da microbiota ou formas menos virulentas, parecem ser responsáveis por alguns casos, tais como *C. pseudodiphtheriticum* (Reynolds, 1996). A identificação de *C. pseudodiphtheriticum* em 8,9% dos casos de pneumonias adquiridas na comunidade (CAP) em adultos despertou atenção particular durante as investigações dos fatores etiológicos das CAP, incluindo patógenos atípicos em Lublin, Polônia (Szmygin-Milanowska *et al.*, 2003). A análise dos casos de CAP revelou pacientes infectados com *C. pseudodiphtheriticum* como a única espécie responsável pela infecção. Em outros casos, *K. pneumoniae* e *S. aureus* foram considerados como agentes sinérgicos na infecção (Chudnicka *et al.*, 2003).

Amostras clínicas de escarro foram obtidas de pacientes em que *C. pseudodiphtheriticum* foi isolado em quantidade crítica, indicando-o como agente etiológico da infecção. *C. pseudodiphtheriticum* foi responsável pelo maior número de casos de pneumonias comunitárias onde ocorreu envolvimento de micro-organismos corineformes; seguido de *C. striatum*/*C. amycolatum*, *Brevibacterium sp*., *C. propinquum*, além de *C. afermentans*, *C. jeikeium*, *Corynebacterium* grupos G e F1, *C. accolens* (Chudnicka & koziol-Montewka, 2003).

Estudos adicionais a respeito das características clínicas e microbiológicas da infecção respiratória por *C. pseudodiphtheriticum* revelam casos de infecção mista com *Streptococcus pneumoniae*. A faixa etária de pacientes com infecção respiratória devido ao *C. pseudodiphtheriticum* variou de 24 a 77 anos; a relação entre os gêneros masculino e feminino foi 3:1. Culturas de escarro demonstraram a presença do *C. pseudodiphtheriticum* em contagens superiores a 10^7 UFC/ml. Também foi observado no mesmo estudo uma resposta aumentada de neutrófilos no escarro de pacientes infectados, mostrando, através da coloração de Gram e microscopia eletrônica do material clínico, a fagocitose de *C. pseudodiphtheriticum* pelos neutrófilos. Um dos pacientes faleceu por complicações do processo infeccioso disseminado (coagulação intravascular disseminada), por *C. pseudodiphtheriticum* (Ahmed *et al.*, 1995).

Pacientes com infecção respiratória com *C. pseudodiphtheriticum* desenvolveram pneumonia e bronquite. O início da sintomatologia pode ser agudo para a maioria dos pacientes, mas a febre é normalmente ausente em quase dois terços dos casos. Condições sistêmicas predisponentes incluíram obstrução de válvulas cardíacas, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e *diabetes mellitus* (Yoshitomi *et al.*, 1992; Manzella *et al*., 1995). *C. pseudodiphtheriticum* tem sido descrito raramente em indivíduos com doenças malignas (Cimolai *et al*., 1992; Manzella *et al*., 1995; Martins *et al*., 2009).

Apesar de ser um patógeno respiratório que incide em pacientes imunocomprometidos, o *C. pseudodiphtheriticum* tem sido raramente relatado em infecções em indivíduos portadores do HIV (Cohen *et al.*, 1992; Roig *et al.*, 1993; Gutierrez-Rodero *et al.*, 1999; Camello *et al*., 2009). A infecção pelo *C. pseudodiphthteriticum* em indivíduos HIV positivos surge mais tardiamente no curso da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e responde bem ao tratamento com antibióticos apropriados na maioria dos casos. Até o momento, todos os pacientes foram do sexo masculino com contagem média de linfócitos CD4 de 110 células/mm^3 (escala 18-198/mm^3); O início da sintomatologia foi geralmente agudo e o aspecto radiográfico mais comum era de pneumonia infiltrativa alveolar ou com cavitação acompanhada da infusão pleural. As cepas de *C. pseudodiphtheriticum* foram isoladas de amostras de broncoscopia, biópsia de pulmão ou escarro. A cultura quantitativa de amostras broncoscópicas obtidas através de lavado bronco-alveolar ou procedimento de cateter produziu mais de 10^3 UFC/ml (Gutierrez-Rodero *et al.*, 1999). Foi também descrito um caso de abscesso pulmonar envolvendo *C. pseudodiphtheriticum* em paciente com AIDS (Andavolu *et al.*, 1986).

C. pseudodiphtheriticum é encontrado também como causa de pneumonia em hospedeiros imunocompetentes (Chiner *et al.*, 1999; Gompelmann *et al.*, 2011). O curto intervalo entre infecções respiratórias com *C. pseudodiphtheriticum* em pacientes imunocompetentes está associado geralmente com COPD pré-existente, e associado algumas vezes com intubação endotraqueal (Miller *et al.*, 1986; Rikitomi *et al.*, 1987; Craig *et al.*, 1991; Freeman *et al.*, 1994).

Pneumonia por *C. pseudodiphtheriticum* também pode ser desenvolvida dentro do ambiente nosocomial (Martaresche *et al.*, 1999). Pode ocorrer também infecção oportunista do pulmão (bronquiolites e bronquites) com *C. pseudodiphtheriticum* após transplante de pulmão e coração (Burke *et al.*, 1997)

A epidemiologia da endocardite infecciosa vem mudando consideravelmente nos últimos 30 anos, ocorrendo crescente aumento dos casos por micro-organismos considerados raros ou incomuns (MacMurdo & Sande, 2000), incluindo *C. pseudodiphtheriticum* (Lindner *et al.*, 1986; Cauda *et al.*, 1987; Morris & Guild, 1991; Wilson & Shapiro, 1992; Rivero *et al.*, 2003). O *C. pseudodiphtheriticum* já foi isolado de endocardite valvular mitral e de próteses valvulares. (Morris & Guild, 1991; Wilson & Shapiro, 1992; Rivero *et al.*, 2003).

Descrições de processos infecciosos por *C. pseudodiphtheriticum* em crianças são escassas. Foram descritos anteriormente, faringites exsudativas (Ellner, 1997; Izurieta *et al.*, 1997) e linfadenites supurativas (LaRocco *et al.*, 1987). Além disso, foi relatado um caso de pneumonia pelo *C. pseudodiphtheriticum* em um menino de 6 anos recebendo quimioterapia para leucemia linfocítica aguda (Cimolai *et al.*, 1992). Recentemente foi relatado um surto de infecção por *C. pseudodiphtheriticum* em crianças com fibrose cística, evidenciada por tosse, rinite e exarcebações pulmonares (Bittar *et al.*, 2010). Em contraste, vários casos relatados de infecção por *C. pseudodiphtheriticum* em pacientes idosos, incluindo: endocardites (Wilson & Shapiro, 1992); CAP (Williams *et al.*, 1991) e pneumonia nosocomial (Martaresche *et al.*, 1999; Nhan *et al.*, 2012); traqueobronquites supurativas (Ramos Rincom *et al.*, 1998); ceratites e conjuntivites (Li & Lal, 2000); discites (Wright *et al.*, 1995) e úlceras de pele (Hemsley *et al.*, 1999).

As corinebactérias, raramente causam infecções de superfície ocular. Entretanto, a presença de defeitos na córnea e conjuntiva em pacientes imunocomprometidos pode resultar em infecções (ceratites e conjuntivites) por organismos considerados anfibiônticos, como *C. pseudodiphtheriticum* (Li & Lal, 2000). *C. pseudodiphtheriticum* também pode causar artrite grave quando inoculado em articulações durante artroscopia (Kemp *et al.*, 2005; Erturan *et al.*, 2012). Erturan e colaboradores (2012) relataram o primeiro caso de artrite séptica causada

por *C. pseudodiphtheriticum*. Deste modo, os diversos fatos descritos acima enfatizam o amplo espectro de quadros de infecções que podem ser causadas pelo *C. pseudodiphtheriticum*.

O teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de *C. pseudodiphtheriticum* demonstraram uma sensibilidade uniforme a penicilina e vancomicina com resultados variáveis para eritromicina (Freeman *et al.*, 1994; Kellogg & Parsey, 1995; Gutierrez-Rodero *et al.*, 1999; Chudnicka *et al.*, 2003). Foi observada também resistência a clindamicina (Colt *et al.*, 1991), lincomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol (Gutierrez-Rodero *et al.*, 1999) e ácido nalidíxico e susceptibilidade intermediária a ofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina (Ahmed *et al.*, 1995).

As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) da penicilina, amoxicilina, cefamandole, cefalexina, e rifampicina foram todas ≤ 0,12 mg/L. As CMIs da vancomicina e ciprofloxacina para todas as amostras foram ≤ 0,5 mg/L. A tobramicina foi o antimicrobiano mais ativo dentre os aminoglicosídeos, com CMIs para todas as amostras ≤0,12 mg/L. Resultados previamente relatados indicam que a penicilina isolada ou em combinação com um aminoglicosídeo deve ser efetiva para o tratamento clínico. Alguns autores acreditam que a vancomicina deve ser usada nas infecções do trato respiratório causadas por difteróides (Craig *et al*., 1991). Outros autores sugerem que a vancomicina deve ser utilizada nos pacientes com endocardites que são alérgicos a penicilina (Cauda *et al.*, 1987; Morris & Guild, 1991). Foi relatado que dois pacientes dos cinco casos descritos de endocardite valvular por *C. pseudodiphtheriticum* foram a óbito, os outros pacientes foram tratados com sucesso com antibiótico e ocorreu reimplante da válvula. Alguns pacientes foram tratados com sucesso com penicilina (Morris & Guild, 1991) ou vancomicina (Cauda *et al.*, 1987).

De acordo com Inoue e colaboradores (1985), uma beta lactamase ativa sobre a carbenicilina pode ser produzida por amostras de *C. pseudodiphtheriticum.*

O isolamento de difteróides a partir de amostras clínicas, incluindo escarro de paciente com infecção do trato respiratório, não deve ser descartado como contaminação. O isolamento, a identificação e o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de *C. pseudodiphtheriticum* isolado do trato respiratório podem fornecer informações valiosas para o tratamento dos pacientes (Colt *et al.*, 1991; Manzella *et al*., 1995; von Graevenitz *et al.*, 1998; Morinaga *et al*., 2010).

Os dados enfatizam a necessidade de investigar os fatores de virulência possivelmente expressos por amostras clínicas de *C. pseudodiphtheriticum* que possam justificar o

envolvimento destes micro-organismos oportunistas em processos infecciosos diversos, inclusive no ambiente nosocomial.

1.1 **Estudos do potencial patogênico de diferentes espécies de corinebactérias**

Embora a habilidade de colonizar superfícies hospedeiras seja considerada como um importante mecanismo de patogenicidade para muitas espécies bacterianas (Ofek & Doyle, 1994), poucos estudos foram desenvolvidos com micro-organismos corineformes de importância médica. As investigações mais recentes têm sido voltadas para a análise das propriedades adesivas do *C. diphtheriae* através de modelos experimentais diversos. A natureza multifatorial da adesividade deste patógeno pode ser considerada, uma vez que, as amostras, independente da expressão do gene *tox*, puderam aderir a diferentes substratos em intensidades variadas (Mattos-Guaraldi *et al*., 2000; Santos *et al*., 2010).

A reação de hemaglutinação tem sido utilizada como modelo experimental para demonstrar a habilidade de corinebactérias aderir a membranas de células hospedeiras. Investigações iniciais demonstraram que além de amostras de *C. diphtheriae*, *Corynebacterium renale* e *Corynebacterium kutscheri*, uma única amostra testada de *C. pseudodiphtheriticum* também exibiu atividade adesiva frente a hemácias de carneiro tripsinizadas. Estruturas fímbriais de aspecto semelhante, sem rigidez, com tendência à formação de feixes e incapazes de aderir a hemácias de carneiro não tripsinadas foram observadas em amostras de todas as espécies do gênero. As amostras hemaglutinantes exibiram elevado grau de fimbriação (91 a 100%) (Yanagawa & Honda, 1976). Micro-organismos como o *C. renale* e *Corynebacterium pilosum*, foram capazes de expressar características hidrofóbicas similares entre os clones mais e menos aderentes, fimbriados (P+) e afimbriados (P-), respectivamente (Ito *et al*., 1987). Amostras de *C. diphtheriae* que expressavam hemaglutininas 67-72p apresentaram-se afimbriadas e com superfície celular hidrofóbica (Colombo *et al*., 2001). Para o *C. diphtheriae* a intensidade da atividade hemaglutinante foi sugerida como um fator responsável pela formação do estado de portador (Kostyukova & Karas, 1991). Investigações demonstraram que proteínas de 67-72 kDa (67-72p), de natureza não fimbrial foram capazes de participar no processo de interação de *C. diphtheriae* com membranas de hemácias humanas (Colombo *et al*., 2001) e células imortalizadas de epitélio, HEp-2 (Hirata Jr *et al*., 2002; Sabbadini *et al*., 2012).

A capacidade adesiva às células epiteliais de mucosa bucal (BEC), de linhagem celular HEp-2 e células epiteliais diferenciadas e não diferenciadas foi demonstrada em micro-organismos corineformes isolados de superfície cutânea, em intensidades variadas. À exceção

das amostras controle de *C. diphtheriae* e *C. minutissimum*, os micro-organismos estudados apresentaram maior capacidade adesiva às células humanas diferenciadas do que aos demais tipos celulares utilizados (Romero-Steiner *et al*., 1990).

Estudos posteriores, utilizando várias amostras de *C. diphtheriae* demonstraram a capacidade de aderência a células HEp-2 em intensidades variadas. A maioria das amostras do biotipo não fermentador de sacarose apresentou forte (≥ 10 bactérias/célula) capacidade adesiva às células HEp-2, em contraste ao observado com o biotipo fermentador (Hirata *et al*., 2004).

Os estudos relativos à capacidade de interação de amostras fimbriadas de *C. urealyticum* com células uroepiteliais humanas demonstraram que tanto amostras provenientes de urina de pacientes com bacteriúria, quanto da pele de indivíduos assintomáticos, foram capazes de aderir à superfície celular (Marty *et al*., 1991). A análise da interação entre amostras de *C. renale* e diferentes tipos celulares demonstrou uma relação direta entre a expressão de fímbrias e a aderência à superfície celular (Honda & Yanagawa, 1974). A interação entre amostras piliadas (P+) de *C. renale* e células epiteliais de bexiga bovina foi dependente do pH do meio, sendo mais acentuada em pH superior a 7,6 (Takai *et al*.,1980).

Estudos de microscopia eletrônica descreveram a presença de quantidade moderada de material flocular de composição lipídica na superfície de *C. diphtheriae*. Envoltório lipídico semelhante foi observado em amostras virulentas de *C. pseudotuberculosis* (*C. ovis*) por pesquisadores que também sugeriram seu papel como mediador de aderência nesta espécie (Reyn *et al*., 1966).

Bactérias corineformes podem apresentar polissacarídeos e ácidos teicóicos ligados covalentemente à peptideoglicana de suas paredes celulares. Três tipos de polímeros de parede celular podem estar presentes - arabinogalactana, polissacarídeos neutros e ácidos teicóicos, entretanto, aquelas com ácidos teicóicos na parede não apresentam polissacarídeos neutros ou arabinogalactana na superfície celular. Arabinogalactanas são encontradas em micro-organismos que também apresentam ácido meso-diaminopimélico na sua superfície. O grupo CMN (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*) é bioquimicamente similar quanto à composição de mureína, ácidos graxos e ácidos micólicos. Todas as espécies do gênero *Corynebacterium* apresentam, até então, arabinogalactana como polímero de parede celular (Takeuchi & Yokota, 1989).

A presença de slime de aspecto estrutural semelhante ao observado em amostras de estafilococos coagulase-negativos foi demonstrada em amostras multirresistentes de *Corynebacterium spp*. isoladas de válvulas hidrocefálicas (Bayston *et al*., 1994).

Os resíduos de carboidratos frequentemente participam de interações micro-organismo-hospedeiro que ocorrem com as superfícies cutâneo-mucosas e com o sistema imunológico. Muitas interações envolvem a ligação de carboidratos do hospedeiro com proteínas lectina-like (similares) bacterianas, entretanto a interação específica entre proteínas do hospedeiro e carboidratos de superfície bacteriana também ja foi documentada (Ofek & Doyle, 1994). A produção de polissacarídeos tem sido relacionada com a capacidade de aderência às superfícies inertes sólidas de micro-organismos corineformes de importância médica. A aderência ao vidro foi relacionada com a presença de glicocálix em diversas espécies bacterianas (Bayston *et al*., 1994). Para o *C. diphtheriae* os carboidratos de superfície parecem atuar como adesinas que permitem a fixação dos micro-organismos ao vidro. Os estudos revelaram a presença de moléculas receptoras de lectinas com afinidade para resíduos de N-acetil-D-galactosamina (D-GalNAc), D-galactose, D-manose, N-acetil-D-glucosamina (D-GlcNAc) e ácido siálico na superfície do *C. diphtheriae*. Nas amostras do biotipo fermentador predomina a expressão de resíduos de ácido siálico (carga negativa) o que pode favorecer a implantação e manutenção da espécie nas superfícies cutâneo-mucosas uma vez que, em geral, essas moléculas auxiliam os micro-organismos no escape contra o sistema imunológico do hospedeiro (Mattos-Guaraldi *et al*., 1999a).

1.2 **Mobilização do citoesqueleto em resposta aos patógenos bacterianos**

Para alguns patógenos, os mecanismos de internalização desencadeados estão associados ao efeito combinado dos microfilamentos e microtúbulos da célula hospedeira (Yoshida *et al*., 2002, Biswa *et al*., 2003). Estudos pioneiros com *C. diphtheriae*, demonstraram a co-participação e a possível associação entre citoesqueleto de actina, das proteínas tirosina-quinases e dos microtúbulos nos processos de internalização (Hirata Jr. *et al*., 2002; Vale, 2003; Santos *et al*., 2010).

O citoesqueleto é composto por filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, que acumulam funções como organização citoplasmática e da forma celular, manutenção da estrutura e movimento intra e intercelular. Para engolfar grandes partículas, células eucarióticas rapidamente alteram sua forma. Esta mudança morfológica, na maioria das vezes, requer uma modulação da arquitetura do citoesqueleto, a qual pode ocorrer em resposta a diferentes estímulos extracelulares (Goldberg, 2001; Gruenheid & Finlay, 2003).

Muitos patógenos são capazes de direcionar sua captura, deste modo ganhando acesso ao interior de células eucarióticas não fagocíticas e escapando de ambientes hostis. Este processo de internalização pode ocorrer através de estratégias que exploram as funções celulares normais (Grassmé *et al*., 1996; Finlay & Falkow, 1997). Mecanismos que levam ao rearranjo do citoesqueleto das células do hospedeiro são desenvolvidos por inúmeros micro-organismos. Esta habilidade é favorável não só à sua sobrevivência e aos processos de aderência e invasão às células, mas também ao tráfico intra e intercelular e à evasão do interior de macrófagos (Rosenshine, 1998; Gruenheid & Finlay, 2003).

A diminuição da capacidade adesiva e/ou da internalização bacteriana por células eucarióticas é, geralmente, visualizada após o tratamento celular com agentes que alteram a organização da actina, como citocalasinas, sugerindo a necessidade dos microfilamentos neste processo (Rosenshine, 1998).

Um outro mecanismo de invasão, pouco definido, é dependente de microtúbulos (Oelschlaeger *et al*., 1993). Apesar da inaparente participação dos microtúbulos no processo de internalização de diversas espécies bacterianas, algumas se apresentam influenciadas pela utilização de inibidores de microtúbulos, como a colchicina e o nocodazol (Meyer *et al*., 1999).

Os patógenos podem lançar mão de alternativos sinais de captura para a invasão de diferentes tipos celulares, podendo a fosforilação de proteínas (tirosina-quinases) funcionar como um deles, visto que parecem participar de vários processos de internalização de partículas por células eucarióticas (Rosenshine *et al*., 1994). A invasão de células de mamíferos pode envolver a ativação ou inibição de diferentes vias de transdução de sinais (Bliska *et al*., 1993; Chen & Zychlinsky, 1994). Uma forte ligação entre internalização e sinalização em células hospedeiras, através de proteínas tirosina-quinases, tem sido documentada em várias interações célula hospedeira-bactéria (Rosenshine *et al*., 1994; Isberg, 1996).

Bactérias utilizam amplamente da dinâmica do citoesqueleto da célula hospedeira para o desenvolvimento dos mecanismos de aderência e invasão (Finlay & Falkow, 1997; Niemann *et al*., 2004). Um pequeno número de espécies bacterianas parece ganhar o interior de células através de digestão enzimática da membrana celular, subsequente à aderência, como é observado em amostras de *Rickettsia* (Walker *et al*., 1984). Micro-organismos como o *Toxoplasma gondii* podem invadir ativamente as células do hospedeiro (Morisaki *et al*., 1995).

1.3 Participação de glicoproteínas de matriz extracelular nos processos de interação celular

Atualmente foi relatado que *C. diphtheriae* pode ser capaz de explorar a interação com o Fbg humano no processo de colonização, manutenção nas superfícies do hospedeiro e/ou dispersão para outros sítios corpóreos, uma vez que, isolados deste micro-organismo exibiram a capacidade de interagir com o Fbg humano e também apresentaram a habilidade de converter Fbg em fibrina (atividade de coagulase), mesmo quando desprovidas do gene tox (Sabbadini *et al*., 2010).

De fato a adesão de micro-organismos a tecidos do hospedeiro é um evento crucial no desenvolvimento da infecção e é relacionada como o primeiro e principal passo na colonização por micro-organismos patogênicos. A adesão implica que o patógeno reconheça ligantes na superfície do hospedeiro ou um constituinte de matriz extracelular (MEC), tais como fibronectina, fibrinogênio, laminina e colágeno (Mendes-Giannini *et al*., 2006).

Existem dois tipos principais de MEC, o interstício e a membrana basal, e seus componentes estão intimamente associados com as superfícies das células do hospedeiro, nos tecidos. A laminina é encontrada, principalmente, na membrana basal subendotelial, enquanto que a fibronectina e os vários tipos de colágeno estão presentes no interstício, particularmente como parte das fibras reticulares, e na lâmina basal pode-se encontrar colágeno tipo IV, sulfato de heparana e entactina (Liakra & Artio-Harmernen, 1992).

Proteínas de MEC são consideradas os alvos primários para interações específicas entre o micro-organismo e o hospedeiro. Estas proteínas estão firmemente ligadas à superfície das células eucarióticas e existem em um grande número de espécies. Na superfície de tecidos intactos, porém, as proteínas somente são expressas no lado basal das células epiteliais. No entanto, sempre existem injúrias que afetam a superfície epitelial, alterando o padrão de expressão local das células produtoras de proteínas de matriz extracelular e, com isso, facilitando o acesso bacteriano a estas moléculas (Darmstadt *et al*., 1999).

A fibronectina (Fn) é uma glicoproteína multifuncional de massa molecular ≥440 kDa formada por um dímero composto por duas subunidades polipeptídicas unidas por um par de pontes dissulfeto localizado próximo a sua extremidade carboxiterminal. A Fn desempenha papel importante na adesão e migração celular, sendo sintetizada por células epiteliais e endoteliais e encontrada nos fluidos corporais, tecido conjuntivo e membrana basal. A Fn

solúvel é amplamente distribuída em fluídos corporais e pode ser encontrada nos líquidos cérebro-espinhal, sinovial, amniótico, seminal, vaginal, saliva e exsudatos inflamatórios. A Fn plasmática também é capaz de desempenhar papel de opsonina, auxiliando na remoção de restos celulares pelos fagócitos (McKeown-Longo, 1987), além de estimular outras atividades imunológicas, incluindo a expressão de receptores Fc na superfície de macrófagos, aderência e quimiotaxia de fagócitos ativados e a deposição de componentes do complemento em superfícies imunologicamente reativas (Dunne, 1989; Pankov & Yamada, 2002). Na forma solúvel, a Fn apresenta sítios de ligação para moléculas glucosaminoglicanas, glicose, proteoglicanas e colágenos (Gatner & Agin, 1980; Vercellotti *et al*., 1984).

A relevância da Fn nos processos de aderência e invasão a células hospedeiras por micro-organismos patogênicos vem sendo elucidado. A Fn pode atuar como uma ponte molecular unindo proteínas ligadoras de Fn, expressas na superfície da célula bacteriana, à superfície de células humanas. Por exemplo, estudos já realizados com amostras de *S. aureus* revelaram que este importante patógeno humano é capaz de se ligar à Fn e de alcançar a corrente sanguínea revestindo-se de Fn solúvel. Assim, este micro-organismo poderia, então, aderir mais facilmente aos tecidos do hospedeiro e ser incorporado aos coágulos ou aos componentes de matriz subendoteliais (Schwarz-Linek *et al.*, 2004).

Moléculas de uma família de adesinas de superfície chamadas MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* - Componentes da Superfície Microbiana Reconhecedores de Moléculas Adesivas de Matriz) são conhecidas por mediarem à aderência bacteriana a componentes de matriz extracelular do hospedeiro, incluindo a Fn e o fibrinogênio (Mongodin *et al*., 2002; Walsh *et al*., 2004; Keane *et al*., 2007). As MSCRAMMs podem ser agrupadas dentro de famílias, de acordo com a proteína-alvo da matriz extracelular (Joh *et al*., 1999). Vale ressatar que existem micro-organismos que apresentam várias proteínas de superfície capazes de ligar a um mesmo tipo de proteína de matriz extracelular (Kreikemeyer *et al*., 2004; Nyberg *et al*., 2004). Amostras de *C. diphtheriae* apresentaram diferentes graus de reatividade à Fn de plasma humano (Souza *et al*., 2000). A hemaglutinina 67-72p foi capaz de interagir com a Fn, sugerindo que estas moléculas podem ser consideradas fibrolectinas (ligantes de Fn), em vista de participarem do processo de interação com glicoproteínas solúveis ou de MEC.

O fibrinogênio (Fbg), uma glicoproteína de 340kDa, é composto por dois grupos de três cadeias peptídicas (Aα, Bβ e γ) ligadas por pontes dissulfeto, sendo encontrado no plasma na concentração de 100 a 700mg/dL. Cada molécula de Fbg contém dois domínios externos (domínios D) conectados através de uma sequência polipeptídica helicoidal a um domínio

central (domínio E) (Fuss *et al.*, 2001; Mosesson, 2005). O Fbg é sintetizado primariamente no fígado, sob condições normais, podendo ser também produzido pelo intestino ou pulmões em condições de estresse e inflamatórias (Lawrence *et al*., 2004). Sua secreção e as concentrações plasmáticas podem ser moduladas por citocinas pró-inflamatórias, especialmente pela interleucina-6 (IL-6), podendo a concentração de IL-6 ser regulada pela fibrina ou produtos da degradação do Fbg. Além disso, alguns autores documentaram que os processos de aderência e invasão a células endoteliais, realizados por *S. aureus*, são capazes de regular a expressão desta citocina (Söderquist *et al*., 2006).

O Fbg plasmático participa diretamente na coagulação sanguínea (hemostasia), agregação plaquetária e em funções do endotélio, apresentando papel também na adesão de monócitos e na proliferação do músculo liso. Por meio de mecanismos hemostáticos e inflamatórios, o nível de Fbg está diretamente relacionado à formação de trombos (Ernest *et al*., 1997; Flick *et al*., 2004; Sun, 2006). Portanto, o Fbg participa de diversos processos fisiológicos e, também, na fisiopatologia de várias doenças infecciosas e não infecciosas, possuindo função principal no processo de coagulação sanguínea.

A partir da clivagem proteolítica do Fbg em fibrina, que é onde culmina a cascata de coagulação, forma-se uma rede que retém plaquetas, eritrócitos, polimorfonucleares e outras proteínas plasmáticas (Mosesson, 2005). Esta cascata é didaticamente separada nas vias extrínseca e intrínseca, as quais ocorrem simultaneamente e são dependentes de fatores humorais e celulares. Após lesão nos vasos sanguíneos, o fator tecidual (tromboplastina) desencadeia a via extrínseca, enquanto o contato do fator XII (fator de Hageman) e das plaquetas com o colágeno da parede vascular leva à via intrínseca, iniciando, então, o processo de coagulação (Guyton & Hall, 1997).

As células endoteliais constituem a interface entre sistema sanguíneo e os tecido subjacentes (Söderquist *et al*., 2006). Quando intacto, o endotélio vascular é ativamente antitrombótico, tornando-se pró-trombótico se lesado ou ativado. Papel de extrema importância é assumido pelo tecido endotelial devido à modulação do processo de coagulação sanguínea, já que uma vasoconstrição local é promovida a partir da produção de endotelina pelo endotélio lesado. É importante salientar que o tecido endotelial também é produtor de tromboplastina, indutor principal da clivagem do Fbg pela via extrínseca. Além disso, a célula endotelial constitui a fonte primária de matriz extracelular subendotelial, que é rica em proteínas como o colágeno. Por sua vez, o colágeno é capaz de ligar o fator de von Willebrand, intermediário na ativação de plaquetas e na ligação das mesmas ao tecido subendotelial lesado (Almeida, 2006).

A conversão do Fbg em fibrina também assume importância no mecanismo imune inato. Os mecanismos de ativação do complemento que ocorrem a partir da invasão bacteriana nos tecidos hospedeiros acarretam o aumento da permeabilidade vascular, levando à formação de edema e difusão de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial. Citocinas, colágeno e elastina também ativam o tecido endotelial (Sun, 2006). Não obstante, o Fbg extravasado por conta do aumento da permeabilidade dos vasos é convertido em fibrina, que possui sítios expostos, muitas vezes ocultos na molécula do Fbg. Estes sítios são capazes de se ligarem à Fn plasmática e a outras moléculas, incluindo os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF2) e IL-1, amplificando a atividade angiogênica e a síntese de colágeno do tipo I pelos fibroblastos, o que favorece a formação da cápsula fibrosa que envolve processos infecciosos como os abscessos (Mosesson, 2005; Sun, 2006).

Segundo Almeida (2006), desordens no processo de coagulação são causas majoritárias de patologias. O processo de coagulação, com formação de trombos, pode ser iniciado em qualquer situação na qual haja lesão endotelial com exposição das proteínas de matriz extracelular - seja ela física, necrótica ou apoptótica (Herwald *et al.*, 2004).

Microtrombos intravasculares têm sua formação induzida por células endoteliais que produzem grande quantidade de fator tecidual, sob a ação de fator de necrose tumoral (TNF) e lipopolissacarídeo (LPS). Os microtrombos são capazes de interagir com plaquetas e induzir amplificação do processo de coagulação (através da produção de trombina, inibindo a fibrinólise). Tal processo, que pode ser observado durante a patogênese da meningococcemia e na sepse, é denominado coagulação intravascular disseminada (Sun, 2006). Ainda, segundo este autor, a trombose dos capilares limita a difusão hematogênica de micro-organismos para outros tecidos. Os trombos estão geralmente associados ao sítio onde ocorreu a lesão endotelial, no entanto podem se desenvolver em qualquer ponto do sistema cardiovascular (Hirsch *et al*., 2001).

De fato, a capacidade de ligação ao Fbg tem sido documentada para algumas espécies de bactérias patogênicas, sendo esta ligação mediada por proteínas de superfície (O'Brien *et al*., 2002; Fitzgerald *et al*., 2006). Ao longo dos últimos anos, várias proteínas ligadoras de Fbg têm sido descritas e caracterizadas. Essas proteínas podem ser divididas em duas categorias: as MSCRAMMs e as moléculas adesivas secretáveis de repertório expandido (SERAMs), estas últimas ligam-se posteriormente à superfície bacteriana (Nitsche-Schmitz *et al*., 2007; Rivera *et al*., 2007). É importante salientar que muitas das proteínas ligadoras de Fbg atuam como adesinas e/ou invasinas, como previamente documentado para os seguintes micro-organismos: *S. aureus* (Hussain *et al*., 2001; Palma *et al*., 2001; Perkins *et al.*, 2001;

Que *et al*., 2001; Hussain *et al*., 2002; Harraghy *et al*., 2003; Que *et al*., 2005; Hussain *et al*., 2008; Piroth *et al*., 2008); *Staphylococcus epidermidis* (Davis *et al*., 2001; Hartford *et al*., 2001; Brennan *et al*., 2009); *Enterococcus faecalis* (Sillanpää *et al*., 2009); *Streptococcus pyogenes* (Courtney *et al*., 2002; Herwald *et al.*, 2004; Carlsson *et al*., 2005; Courtney *et al*., 2006), *Streptococcus agalactiae* (Schubert *et al*., 2004; Gutekunst *et al*., 2004; Tenenbaum *et al*., 2005; Rosenau *et al*. 2007); *Streptococcus mutans* (Beg *et al*., 2002), *Porphyromonas gingivalis* (Pathirana *et al*., 2006; Sahingur *et al*., 2006) e *C. diphtheriae* (toxinogênica e não toxinogênica) (Sabbadini *et al*., 2010). A habilidade de ligar-se ao Fbg não está limitada às bactérias. A interação com esta molécula por parte de dois fungos oportunistas, *Candida albicans* (Viudes *et al.*, 2001; Marcil *et al*., 2008) e *Aspergillus fumigatus* (Tiralongo *et al*., 2009) tem sido documentada.

1.4 **Mecanismos de morte de células eucarióticas**

Recentemente, Sabbadini e colaboradores 2012 evidenciaram que a proteína 67-72p de *C. diphtheriae* também pode atuar como invasina e proteína apoptótica, participando dos mecanismos de invasão, sobrevivência e subsequênte apoptose em células epiteliais, o que pode explicar a persistência e disseminação de *C. diphtheriae* no hospedeiro. A morte celular é um processo ativo realizado por organismos multicelulares que estabelecem a homeostase, na dependência de sua capacidade de produzir novas células e de destruir células que tenham se tornado desordenadas ou nocivas. São bem caracterizados dois tipos de morte celular: necrose e apoptose. No entanto, a morte celular pode ser uma estratégia de um microrgaismo patogênico para escapar a partir da célula hospedeira infectada afim de invadir as camadas mais profundas da mucosa para a colonização bacteriana prolongada (Martin, 2010).

A necrose parece ser um processo de morte celular provocado por lesão aguda, usualmente sendo causada por dano irreversível à célula e às organelas, em especial às de natureza membranosas. Células necróticas apresentam características específicas, como perda da integridade da membrana celular, que leva à difusão de íons, rápida turgência e lise celular, floculação da cromatina, aumento de volume e liberação do conteúdo intracelular, ocorrendo uma tendência das células a não participarem ativamente do processo de morte (McConkey, 1998; Savill & Fadok, 2000). Uma característica principal da necrose, geralmente

caracterizada pelo acometimento de um número grande de células, é a inflamação tecidual (Savill & Fadok, 2000).

A palavra necrose normalmente é utilizada para designar morte celular não apoptótica. No entanto, alguns autores alegam que o termo aplica-se às mudanças morfológicas acima descritas observadas tanto em células que sofreram morte acidental, quanto na fase avançada de células com morte programada (Majno & Joris, 1995).

O termo apoptose (do grego: decadência) foi primeiramente descrito por Kerr e colaboradores (1972), sendo um processo ativo, que requer ativação de proteínas da própria célula para a ocorrência da morte celular; e fisiológico, estando envolvido na homeostase de organismos multicelulares (Hetts, 1998). Este termo foi empregado para descrever um padrão de alterações morfológicas associado à morte celular programada. Tais alterações incluem contração celular, perda de contato com células vizinhas, condensação do material nuclear, deformação do núcleo e formação de corpúsculos apoptóticos. Bioquimicamente, ocorre fragmentação do DNA em multímeros de 200pb, correspondentes ao tamanho de um nucleossoma. A exposição de fosfatidilserina na superfície celular, resultante da perda de assimetria dos fosfolipídeos da membrana plasmática, também é uma característica de células apoptóticas. A fagocitose dos corpúsculos apoptóticos tende a limitar o processo de inflamação do tecido (Fadok *et al*., 1992; Savill & Fadok, 2000).

Os componentes centrais da maquinaria apoptótica fazem parte de uma família de cisteína proteases, denominadas caspases (*cysteinil, aspartate-specific proteases*), que clivam proteínas alvo específicas após resíduos de aspartato (Ashkenazi & Dixit, 1999); e uma família de proteínas do tipo Bcl-2, que são proteínas, pró e antiapoptóticas, presentes na membrana de mitocôndrias (Thornberry & Lazebnik, 1998). A apoptose pode ocorrer através de vias distintas que vão culminar em um ponto comum. As vias denominadas extrínseca e intrínseca são as mais bem compreendidas (Rossi & Gaidano, 2003). A via extrínseca envolve ligação aos receptores membros da família do fator de necrose tumoral (TNFR), tal como TNFR1, TNFR2 ou Fas. A ligação ao receptor causa oligomerização do mesmo e a ativação de uma caspase iniciadora, a caspase 8, a qual cliva e ativa a caspase 3. Ao contrário, a via intrínseca envolve disfunções mitocondriais. O balanço relativo entre os membros da família Bcl-2 pode promover ou suprimir a liberação de citocromo c do espaço intermembrana mitocondrial. Uma vez liberado, o citocromo c associa-se à proteína adaptadora Apaf-1 (*Apoptosis protease activating factor 1*) para ativar a caspase 9, a qual ativa a caspase 3 (Cande *et al*., 2002). Diferentes mecanismos são utilizados por inúmeros patógenos para induzir a apoptose. Diversos patógenos são armados com uma coleção de fatores de

virulência, que interagem com componentes chaves na indução da morte celular ou interferem com a regulação de fatores de transcrição que monitoram a sobrevivência da célula (Weinrauch & Zychlinsky, 1999). Algumas bactérias produzem toxinas que matam a célula hospedeira através de mecanismos diversos, incluindo apoptose. As toxinas de *C. diphtheria*e (Morimoto & Bonavida, 1992; Kochi & Collier, 1993), *Pseudomonas aeruginosa* (Kochi & Collier, 1993) e *Shigella dysenteriae* (Harrison, 2005) causam a inibição da síntese protéica. Contudo, Santos e colaboradores 2010 relataram que os mecanismos de morte celular devido a infeções provocadas por *C. diphtheriae* não estão exclusivamente associadas à produção de toxina ou presença de gene *tox*. Toxinas de micro-organismos como *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* (Korostroff *et al*., 1998), *Escherichia coli* (Russo *et al*., 2005) e *Staphylococcus aureus* (Bayles *et al*., 1998) induzem a formação de poros na membrana. Aumento da concentração de AMPc intracelular, além da formação de poros na membrana, provocados pela Ac-Hly (adenilato ciclase hemolisina) de *Bordetella pertussis*, também conhecida como CyaA (adenilato ciclase), acarretam a morte programada de alguns tipos celulares (Gueirard *et al*., 1998; Boyd *et al*., 2005).

A apoptose de células imunes que estão respondendo à infecção pode ser induzida por bactérias modulando a resposta imune. Patógenos também podem levar à inibição da apoptose facilitando a replicação intracelular ou sobrevivência. De forma alternativa, o hospedeiro pode induzir a apoptose em células infectadas inibindo a replicação. A limitação do dano tecidual decorrente da inflamação é uma vantagem que pode ocorrer mediante a indução da apoptose pelo hospedeiro. Além disso, macrófagos apoptóticos podem ser usados como fonte de antígenos para a apresentação por células dendríticas (Yrlid & Wick, 2000). A capacidade dos patógenos de induzir ou prevenir a apoptose em macrófagos emerge como um balanço crucial no controle do resultado da infecção (Liles *et al*., 1997).

Interessantemente, alguns patógenos inibem a apoptose em fagócitos e linfócitos, induzindo uma desregulação imune e facilitando sua sobrevivência intracelular, como observado para espécies de *Neisseria* (Massari *et al*., 2000). *Chlamydia psittaci* e outros micro-organismos intracelulares obrigatórios que se multiplicam no interior de macrófagos, podem se beneficiar da inibição da apoptose (Fan *et al*., 1998). Em contraste, aqueles que não têm o macrófago como alvo preferencial podem ser favorecidos com a morte programada desta célula, como *Salmonella typhimurium* (Monack *et al*., 1996) e *B. pertussis* (Gueirard *et al*., 1998). Alternativamente, a promoção da apoptose pode permitir que o micro-organismo escape da primeira linha de defesa imune. A validade de cada uma destas possibilidades depende do tipo de patógeno examinado. No caso do *Mycobacterium tuberculosis* (Keane *et*

al., 2000) e da *P. aeruginosa* (Grassme *et al*., 2000), a indução da apoptose pode ser benéfica ao hospedeiro, estando relacionada à morte dos micro-organismos, assim limitando a multiplicação intracelular ou previndo a sepse.

É importante ressaltar que o processo de apoptose induzido por diferentes micro-organismos ocorre também em células epiteliais, como o observado em infecções por *S. aureus* (Bayles *et al*., 1998), *Clostridium difficile* (Fiorentini *et al.*, 1998), *Helicobacter pylori* (Chen *et al*., 1997), *Aeromonas hydrophila* (Galindo *et al*., 2004) e *Chlamydophila psittaci* (Ojcius *et al*., 1998). No entanto, a internalização do patógeno nem sempre é um evento obrigatório para que ocorra a morte programada da célula.

Proteínas bacterianas tais como BfpA (*bundle-forming pilus*) de *E. coli* (Melo *et al*., 2005), Yop (proteína externa de *Yersinia*) (Monack *et al*., 1997), FHA (hemaglutinina filamentosa) de *B. pertussis* (Öhman *et al*., 2005) e Omp de *Fusobacterium nucleatum* (Kaplan *et al*., 2005) estão, aparentemente, envolvidas na indução de apoptose através de mecanismos moleculares distintos. Atualmente, ainda são pouco explorados os estudos sobre a indução de apoptose por proteínas de superfície bacterianas, estando muitos destes processos em fase de caracterização.

1.5 **Biofilmes bacterianos**

Bactérias sobrevivem em sistemas naturais de uma forma totalmente diferente daquelas cultivadas em laboratórios em meios artificiais. Para persistir em ambientes hostis, como em tecidos do hospedeiro (onde há a presença de anticorpos e fagócitos) ou em superfícies inertes expostas a condições inóspitas (como luz ultravioleta, dessecação, calor e frio), elas se adaptaram formando biofilmes (Costerton *et al*., 1999; Mah & O'Toole, 2001; Olson *et al*. 2002).

Biofilmes são sistemas biológicos com elevado nível de organização, onde micro-organismos formam comunidades estruturadas e funcionais, envolvidas por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas fixadas a superfícies bióticas ou abióticas. Assim, garantem o estabelecimento de um sistema de comunicação que coordena atividades metabólicas para benefício mútuo, bem como a produção de fatores de virulência que facilitam a disseminação no hospedeiro (O'Toole *et al*., 2000; Donlan & Costerton, 2002; Stoodley *et al.*, 2002).

1.5.1 Etapas do desenvolvimento de um biofilme

Em geral, as etapas de desenvolvimento de um biofilme microbiano incluem: (i) a fixação inicial reversível a uma superfície, seguida pela (ii) fixação irreversível e formação de microcolônias, (iii) maturação das microcolônias em um biofilme maduro envolto em exopolissacarídeos (EPS), e, finalmente, (iv) a dispersão, onde células individuais ou em grupos se desprendem do biofilme, retornando ao modo de vida planctônico e, portanto, fechando o ciclo de desenvolvimento de um biofilme (Stoodley *et al*., 2002). Acredita-se que o processo comece quando as bactérias sentem certos parâmetros ambientais que acionam a transição do crescimento planctônico à vida em uma superfície (Davey & O'Toole, 2000).

Vários fatores influenciam a fixação inicial às superfícies, como o tipo e as propriedades do material da superfície, carga e microtopografia, presença de matéria orgânica, temperatura e pH. Outros fatores são as características intrínsecas do micro-organismo, como carga, hidrofobicidade, presença de apêndices superficiais como pili, fímbrias, flagelos e cápsula, além da capacidade de produzir substâncias exopoliméricas (Bower *et al.*, 1996; Chmieleswski & Frank, 2003).

A adesão inicial a superfícies pode ser ativa ou passiva, dependendo da mobilidade das células. A adesão passiva depende da gravidade, da difusão e da dinâmica do fluido. Na adesão ativa, há a participação de flagelos, que facilitam o movimento da célula bacteriana a um sítio específico. Além disso, a síntese de adesinas, pili, polissacarídeos e a formação de agregados também podem influenciar o processo de fixação inicial a um substrato (Chmieleswski & Frank, 2003).

Após a aderência inicial fraca e reversível, as bactérias devem manter contato com a superfície. Porém, para que desenvolvam um biofilme maduro, é necessário que a adesão se torne irreversível. Para tal, precisam se multiplicar, ancorar seus apêndices, produzir exopolímeros e formar microcolônias (Stoodley *et al.*, 2002). Microcolônias são comunidades constituídas de três a cinco camadas de células bacterianas que se desenvolvem após a aderência a uma superfície (Davey & O'Toole, 2000). Sauer & Camper (2001) mostraram que *P. putida,* ao aderir irreversivelmente a um substrato, passou a realizar twitching mediado pelo pilus tipo IV, em vez de utilizar seus flagelos. O'Toole & Kolter (1998) compararam mutantes de *P. aeruginosa* PA14 deficientes na mobilidade mediada por flagelos e deficientes na biossíntese do pilus tipo IV. Poucas células da estirpe imóvel conseguiram aderir à superfície de policloreto de vinila (PVC), o que sugere a participação dos flagelos na etapa

inicial de adesão a superfícies. Já as células mutantes para a síntese do pilus tipo IV formaram monocamadas de células no PVC, mas não desenvolveram microcolônias. Esse resultado indica que o pilus tipo IV é uma estrutura necessária para a formação de microcolônias em *P. aeruginosa*. Além disso, Gerke e colaboradores (1998) mostraram que células aderentes de *S. epidermidis* produziram uma adesina intercelular polissacarídica que uniu mais fortemente as células e facilitou a formação de microcolônias e a posterior maturação do biofilme.

A fase de maturação do biofilme resulta na geração de uma arquitetura complexa com canais e poros que forma sua estrutura tridimensional, a qual pode ser bem espessa e visível a olho nu (Davies *et al*., 1998; Stoodley *et al*., 2002). A estrutura pode ser caracterizada morfologicamente, observando-se propriedades como espessura, densidade e forma. Sauer e colaboradores (2002) demonstraram que células de *P. aeruginosa* em biofilmes maduros apresentaram perfis de expressão gênica muito diferentes, sendo que mais de 50% (cerca de 800 proteínas) foram expressas seis vezes mais do que em células planctônicas. Dentre estas, 300 foram expressas em biofilmes maduros e não em células planctônicas. Estas proteínas pertenciam às cinco principais classes: proteínas do metabolismo de carbono e aminoácidos, biossíntese de fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS), secreção e transporte de membrana e em mecanismos de adaptação e proteção.

A dispersão é a última fase do desenvolvimento de um biofilme. Este termo é geralmente utilizado para descrever o destacamento de células (individuais ou em grupos) de um biofilme ou substrato. O destacamento ativo é um evento fisiologicamente regulado, como demonstraram Allison e colaboradores (1998) e Boyd & Chakrabarty (1995). O primeiro estudo mostrou que, após incubação por longos períodos, o biofilme formado por *P. fluorescens* começou a se destacar, o que coincidiu com a redução na produção de EPS. O segundo estudo observou que a superexpressão de alginatoliase causou a degradação de alginato e produziu biofilmes facilmente removíveis por suaves movimentos. A regulação dependente da densidade celular pode ativar a liberação de enzimas degradadoras de matriz, permitindo que bactérias se desprendam do biofilme quando há uma elevada densidade celular dentro das microcolônias (Stoodley *et al*., 2002). Esta hipótese está de acordo com as observações de Sauer e colaboradores (2002), que compararam padrões de proteínas em géis bidimensionais para mostrar que células de *P. aeruginosa* em dispersão são mais similares às células planctônicas do que as encontradas em biofilmes maduros. Essa descoberta indica que células que se destacam de biofilmes voltam ao modo de crescimento planctônico, fechando, portanto, o ciclo de vida de desenvolvimento de um biofilme.

1.5.2 Infecções associadas a biofilmes bacterianos

A capacidade de formação de biofilme por micro-organismos patogênicos em superfícies inertes ou em tecidos do hospedeiro constitui uma importante origem de muitas infecções persistentes que resistem a respostas do sistema imune. Casos de infecção associada a biofilmes bacterianos incluem exemplos bem conhecidos de infecções relacionadas a dispositivos médicos, como cateteres, articulações artificiais, válvulas cardíacas prostéticas, próteses e lentes de contato. A organização em biofilme protege os micro-organismos da fagocitose e da ativação do complemento. Além disso, a secreção de anticorpos opsonizantes e a produção de peróxido de hidrogênio são ineficazes, uma vez que não conseguem penetrar no biofilme devido à presença da matriz exopolimérica, a qual evita a passagem e a ação destas moléculas (Costerton *et al.*, 1999; Stewart *et al*., 2000; Zimmerli *et al.*, 2004; Fux *et al*., 2005).

Estima-se que 60% das infecções bacterianas e 65% das infecções nosocomiais estejam associadas à formação de biofilme, como por exemplo: cáries (*Streptococcus* spp. acidogênicos), periodontite (bactérias Gram-negativas orais), fascite necrotizante (*Streptococcus pyogenes*), prostatite bacteriana (*E. coli* e outras bactérias Gram-negativas), pneumonia em pacientes com fibrose cística (*P. aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*), endocardite bacteriana (*Streptococcus* do grupo *viridans* e *Staphylococcus* spp.), mastite (*S. agalactiae, S. aureus*), linfadenite (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), enterite (*E. coli, Salmonella* spp.) e infecções de ferida (*S. aureus, P. aeruginosa*) (Costerton *et al.*, 1999; Fux *et al*., 2005).

Mesmo em pacientes imunocompetentes, as infecções relacionadas a biofilmes bacterianos são raramente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, de fato, estas são geralmente crônicas e de difícil tratamento, associadas a sintomas recorrentes, mesmo após ciclos de terapia antimicrobiana, sendo muitas vezes necessária a realização de procedimentos cirúrgicos e/ou uso de altíssimas doses de agentes quimioterápicos para extinção da infecção. Por tudo isso, o custo do tratamento destas infecções é elevado: cerca de um bilhão de dólares por ano (Archibald & Gaynes, 1997; Costerton *et al.*, 1999; Potera, 1999; Fux *et al*., 2005). Cabe ressaltar que, o envelhecimento populacinal e o aumento do número de procedimentos cirúrgicos com implantação de próteses, com fins corretivos e estéticos, espera-se também o aumento do número de infecções associadas a biofilme bacteriano (Stewart & Costerton, 2001; Sousa *et al.*, 2011) podendo resultar em aumento da

freqüência de óbitos, extensão dos períodos de internação e ocorrênia de que danos irreversíveis comprometendo o bem estar e a qualidade de vida dos pacientes.

1.5.3 Participação de glicoproteínas de matriz extracelular na formação de biofilme

O papel de glicoproteínas de MEC na formação de biofilme vem sendo pesquisado. Lembke e colaboradores (2006) mostraram que a Fn, o Fbg, a laminina e o colágeno tipo IV foram capazes de modular a formação de biofilme em cepas de estreptococos do Grupo A. Bonifait e colaboradores (2008) revelaram que o meio de cultura suplementado com Fbg aumentou a formação de biofilme em amostras de *Streptococcus suis* e induziu a resistência à penicilina. Ainda, Vergara-Irigaray *et al.* (2009) observaram que a ausência de proteínas ligadoras de Fn em cepas de *S. aureus* causou uma redução significativa na capacidade de colonizar cateteres *in vivo* após três e sete dias de infecção.

Pouco foi documentado sobre os mecanismos de patogenicidade do *C. pseudodiphtheriticum*, incluindo a capacidade de interação com células e tecidos humanos. Apesar de já ter sido demostrado que *C. diphtheriae* é capaz de se ligar à Fn (Souza, *et al*., 2000) e ao Fbg (Sabbadini, *et al*., 2010), não foram encontrados trabalhos que investigassem a capacidade de interação de *C. pseudodiphtheriticum* com glicoproteínas de MEC, bem como, a participação desses componentes de matriz na formação de biofilme e a sua possível participação no estabelecimento e disseminação da infecção no hospedeiro.

2 **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

Uma vez que a espécie *C. pseudodiphtheriticum* pode ser associada a quadros infecciosos diversos, principalmente pneumonias e endocardite, e que vem apresentando multirresistência aos antimicrobianos utilizados na antibioticoterapia, as investigações relativas ao potencial patogênico da espécie em questão permanecem necessárias. Na fisiopatologia dos processos infecciosos causados pelo *C. pseudodiphtheriticum*, incluindo as endocardites, micro-organismos podem aderir inicialmente a componentes de superfície celular e disseminar através dos tecidos, explorando mecanismos fisiológicos do hospedeiro para evadir o sistema imunológico. A circulação de cepas apresentando potencial invasor e a ausência de trabalhos sobre investigação da capacidade de produzir biofilme, interação com proteínas presentes na matriz extracelular, invasão e indução de apoptose celular de *C. pseudodiphtheriticum* justifica novas análises relativas às interações bacterianas com substratos abióticos e células do hospedeiro. Deste modo, a capacidade de aderência a superfícies abióticas e bióticas, invasão e indução de apoptose celular de *C. pseudodiphtheriticum* ainda não foram bem esclarecidos.

Além do isolamento e identificação de amostras clínicas e cepas multirresistentes de *C. pseudodiphtheriticum*, o presente estudo teve como objetivo geral a pesquisa das propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose através de modelos experimentais desenvolvidos em células epiteliais humana-HEp-2. Neste sentido, uma amostra padrão e amostras de *C. pseudodiphtheriticum* isoladas de espécimes clínicos de diferentes origens foram utilizadas para o desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos:

■ Análise por ensaios de biotipagem e antibiotipagem;

■ Análise quantitativa e qualitativa da formação de biofilme sobre substratos abióticos diversos, incluindo ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL);

■ Avaliação da capacidade da interação bacteriana com os componentes de matriz extracelular, fibrinogênio e fibronectina;

■ Analise qualitativa e quantitativa da interação bacteriana com monocamadas de células epiteliais (linhagem HEp-2) hospedeiras em diferentes tempos de infecção;

■ Análise ultraestrutural dos processos de aderência e internalização celular dos micro-organismos através de microscopia eletrônica de transmissão (MET);

■ Análise da participação de microfilamentos, microtúbulos e da fosforilação de enzimas da classe das tirosina-cinases das células hospedeiras no processo de aderência e internalização bacteriana;

■ Avaliação da capacidade de indução de morte (necrose e/ou apoptose) das células hospedeiras infectadas;

■ Correlação da capacidade de interação com as células hospedeiras com propriedades biológicas descritas acima, incluindo: origem das amostras, perfil de resistência aos agentes antimicrobianos, produção de biofilme e indução de morte celular.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos permitiram a publicação e/ou redação de 04 artigos científicos em periódicos qualificados pela CAPES apresentados a seguir:

1. Camello TC, **Souza MC**, Martins CA, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. *Letters Applied Microbiology* 2009; 48: 458-64. **(Qualis A1)**

2. **Souza MC**, Santos LS, Gomes DL, Sabbadini PS, Santos CS, Camello TC, Asad LM, Rosa AC, Nagao PE, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012; 107: 486-93. **(Qualis A1)**

3. **Souza MC**, Ramos JN, Santos LS, Sousa LP, Sabbadini PS, Santos CS, Nagao PE, Vieira VV, Gomes DLR, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. Biofilm formation and binding activities to fibrinogen and fibronectin by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum.* **(Submetido para publicação – BMC Microbiology) (Qualis A1)**

4. **Souza MC**, Santos LS, Costa AFE, Santos GJ, Conceição SL, Rosa AC, Nagao PE, Hirata Jr R, Santos CS, Mattos-Guaraldi AL. Internalization of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* by epitelial cells induces apoptosis **(Em fase final de redação).**

Artigo 1: *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries.

Autores: Camello TC, **Souza MC**, Martins CA, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL.

Revista: *Letters Applied Microbiology* 2009; 48: 458-64. (**Qualis A1)**

Resumo

O objetivo deste estudo foi examinar e determinar a ocorrência de susceptibilidade antimicrobiana de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* entre os pacientes com infecções bacterianas em hospital universitário brasileiro. Um total de 113 amostras de *C. pseudodiphtheriticum* foram isoladas de pacientes de diferentes grupos etários: adultos 65-48% (18 a ≤ 59 anos), 9-73% idosos (≥ 60 anos); crianças 14-15% (<18 anos); 4-42% recém-nascidos (0-7 dias). As amostras foram identificadas por métodos bioquímicos convencionais e sistema API-Coryne. Os micro-organismos eram em sua maioria relacionados a infecções no trato urinário (29,2%), respiratório (27,45%) e sítios intravenosos (18,6%). Cerca de 32,7% das amostras foram obtidas a partir de pacientes (26 adultos, 4 crianças com idade, 3-4 recém-nascidos) que apresentavam, pelo menos, uma das condições predisponentes: insuficiência renal; transplante renal, AIDS e infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, câncer, cirrose hepática, hemodiálise e uso de cateter. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos revelaram fenótipos multirresistentes. A maioria das cepas demonstraram resistência à oxacilina, eritromicina e clindamicina. Apesar das diferenças significativas na idade e no estado funcional dos pacientes, *C. pseudodiphtheriticum* pode estar implicado como uma causa de infecções respiratórias e não respiratória humanas. Os dados são valiosos para os profissionais indicando a ocorrência de fenótipos multirresistentes e a possibilidade de graves infecções causadas por *C. pseudodiphtheriticum*, um patógeno geralmente subestimado em países emergentes.

Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254

ORIGINAL ARTICLE

Corynebacterium pseudodiphtheriticum isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries

T.C.F. Camello[1], M.C. Souza[1], C.A.S. Martins[1,2], P.V. Damasco[1,3], E.A. Marques[1], F.P. Pimenta[1], G.A. Pereira[1], R.Hirata, Jr[1] and A.L. Mattos-Guaraldi[1]

1 Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
2 Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, Instituto Nacional de Câncer, INCA-Ministério da Saúde Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
3 Escola de Medicina e Cirurgia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Keywords
Corynebacterium pseudodiphtheriticum, emerging countries, end-stage renal disease, multiresistance, newborns, peritoneal fluid, surgical wounds.

Correspondence
Ana L. Mattos-Guaraldi, Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro, 87–Fundos, 3 andar. Vila Isabel, RJ, Brazil. E-mail: guaraldi@pq.cnpq.br; guaraldi@uerj.br

2008/0712: received 27 April 2008, revised 22 October 2008 and accepted 23 November 2008

doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02553.x

Abstract

Aims: To examine the occurrence of and to determine the antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* among patients with bacterial infections at a teaching hospital.

Methods and Results: A total of 113 *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains identified by conventional biochemical methods and API-Coryne System were recovered from patients from different age groups: 65·48% adults (18 to ≤59 years old), 9·73% aged (≥60 years old); 14·15% infants (<18 years old); 4·42% newborns (0–7 days). Micro-organisms were mostly related to infections in the urinary (29·2%) and respiratory tracts (27·45%) and intravenous sites (18·6%). Clinical samples were obtained only from 32·7% patients (26 adults, four aged, four infants and three newborns) presenting at least one of the predisposing conditions: end-stage renal disease; renal transplant; AIDS and *Mycobacterium tuberculosis* infection; cancer, hepatic cirrhosis; haemodialysis and catheter use. Antimicrobial susceptibility tests identified multiresistant phenotypes. Most strains (>50%) were resistant to oxacillin, erythromycin and clindamycin.

Conclusions: Despite significant differences in age and functional status of patients *Coryne. pseudodiphtheriticum* may be implicated as a cause of respiratory and nonrespiratory human infections.

Significance and Impact of the Study: Data are valuable for practitioners indicating the occurrence of multiresistant phenotypes and the possibility of severe infections due to *Coryne. pseudodiphtheriticum*, a pathogen usually overlooked in emerging countries.

Introduction

During the last two decades, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* has been reported to cause human disease, despite its common presence as a harmless commensal of the upper respiratory tract and skin (Janda 1999; Funke and Bernard 2007). *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* has been mostly recognized as a pathogen of the respiratory tract. Cases of nosocomial (Szmygin-Milanowska *et al.* 2003) and community-acquired pneumonia (Chudnicka *et al.* 2003); bronchitis (Ahmed *et al.* 1995; Burke *et al.* 1997; Gutierrez-Rodero *et al.* 1999), tracheitis (Colt *et al.* 1991; Ramos *et al.* 1998), exsudative pharyngitis (Izurieta *et al.* 1997) and rhinosinusitis (Voiriot *et al.* 1986) have been reported. Nonrespiratory infections include endocarditis (Morris and Guild 1991), osteitis/arthritis (Kemp *et al.* 2005), urinary tract infections (UTI) (Nathan *et al.* 1982), suppurative lymphadenitis (LaRocco *et al.* 1987), skin lesions (Cantarelli *et al.* 2008) and conjunctivitis (Li and Lal 2000).

© 2009 The Authors

Corynebacterium pseudodiphtheriticum has been implicated as a cause of infections in severely immunocompromised adults. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection has a high death rate (23%) in severely immunocompromised patients in industrialized countries (Izurieta *et al.* 1997). In various occasions patients suffering from *Coryne. pseudodiphtheriticum* infections had undergone prior invasive procedures, transplants, or underlying medical conditions such as chronic obstructive pulmonary disease, malignancies and AIDS (Nathan *et al.* 1982; Cimolai *et al.* 1992; Burke *et al.* 1997; Szmygin-Milanowska *et al.* 2003; Teixido *et al.* 2007).

However, there are few reports on the pathogenicity of *Coryne. pseudodiphtheriticum* in immunocompetent individuals (Chiner *et al.* 1999), and on the profiles of antimicrobial susceptibility of the clinical isolates from varied sources, particularly in the emerging world. This study was conducted to assess the distribution of *Coryne. pseudodiphtheriticum* isolates in a teaching hospital over a 14 year period, located in Rio de Janeiro metropolitan area, drawing attention to the microbiological and epidemiological aspects of micro-organims isolated from relevant clinical sites.

Materials and methods

Setting, patients and isolates

Between January 1993 and December 2006, a total of 1647 strains of irregular Gram-positive rods-IGPR, including 1446 (87·79%) which were identified as *Corynebacterium* spp., were isolated from 168 872 bacterial cultures from patients enrolled in different wards of a 600-bed teaching hospital. The hospital with intensive care units, renal transplant program and ambulatories serves the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, with 6 million inhabitants.

In this descriptive study, we retrospectively reviewed 113 (7·8%) strains identified as *Coryne. pseudodiphtheriticum* that were recovered from representative clinical sites of patients with signs and symptoms of bacterial infection.

Diagnosis of bacterial infection was staged according to CDC classification (Center for Disease Control and Prevention 1992). Clinical data retrieved included: age, sex, organ dysfunction, transplantation, cancer, AIDS, *Mycobacterium tuberculosis* infection, haemodialysis and catheter use. Data assessment was done on basis on the prontuary's review of patients.

Bacterial cultures and identification procedures

Clinical specimens were inoculated on Columbia agar base added of 5% sheep blood and incubated at 37°C in 3–5% CO_2 atmosphere and monitored for 72 h. *Corynebacterium*-like colonies were selected for further identification when 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 (Funke and Bernard 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, colony count ≥ 10^3 CFU ml^{-1} of potential pathogens was considered as positive. Isolation until two and three species of micro-organisms was regarded as polymicrobial infection for catheter-tips and lower respiratory tract, respectively. Micro-organisms were identified from the urine cultures in Cystine Lactose Electrolytes Deficient agar (CLED; Merck, Darmstadt, Germany), and considered as potential pathogen when the growth was ≥ 10^4 CFU ml^{-1} as the only isolate or ≥ 10^5 CFU ml^{-1} as predominant isolate; ≥ 10^3 CFU ml^{-1} in cases of nephropathies. Blood specimens were inoculated into Bactec Plus anaerobic/aerobic vials and processed in a Bactec 9240 continuous-monitoring system (Becton-Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, USA). All clinical samples yielding more than three organisms were regarded contaminated and discarded (Thomson 2007).

Corynebacterium-like colonies were initially identified by Gram staining, colonial morphology, pigmentation and haemolytic properties. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains characterized by the commercially available semi-automated identification API-Coryne System (bioMérieux, Lyon, France) were decoded by the system API web system [https://apiweb.biomerieux.com]; profiles accepted, 5001004, 300104, 7001004 (all possibility >90%) (Almuzara *et al.* 2006). Micro-organisms were also assayed by the following conventional biochemical tests (Funke and Bernard 2007; Pimenta *et al.* 2008): lipophilia; catalase, urease, gelatinase, deoxyribonuclease and pyrazinamidase activities; nitrate reduction and esculin hydrolysis and CAMP test. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* NCTC 231 strain was used as control.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility profiles to 19 antimicrobial agents were determined by the disc diffusion method, using inocula of 0·5 McFarland standard. Plates were incubated at 35°C for 24 h and re-confirmed at 48 h using a cation-adjusted Mueller-Hinton agar added of 5% sheep blood. Breakpoints for the susceptible strains were used as suggested by the Clinical Laboratory Standards Institute for bacteria excluded from Table 2A to 2K. As there is not yet a defined standard for interpreting these results, the one proposed in CLSI document M45-A

© 2009 The Authors

(ISBN 1-56238-607-7) was used (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2007). The breakpoints for *Staphylococcus aureus* were considered in the cases of penicillin, oxacillin and ampicillin (Martinez-Martinez *et al.* 1995; Weiss *et al.* 1996). The intermediate results were included as resistant. β-lactamase production was evaluated by the Nitrocefin-disc method (Cefinase; Becton-Dickinson, Erembodegen, Belgium).

Results

The results of the analysis of 113 *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains isolated from clinical sites of patients of different age groups in which infection was suspected are displayed in Table 1. The pathogen was mostly (94·7%) recovered in pure culture from clinical specimens. Numerically predominant colonies of *Coryne pseudodiphtheriticum* were observed in seven polymicrobial cultures from pulmonary samples (12·9%) and catheter tips (9·53%).

Corynebacterium pseudodiphtheriticum strains were predominantly (65·48%) isolated from adults at working age followed by 14·15% children under the age of legal adulthood (infants), 9·73% aged and 4·42% newborns; 49% from males (76% adults, 16% infants, 8% aged) and 51% from females (71% adults; 16% infants, 13% aged).

Table 1 *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* 113 strains isolated from patients of a university hospital – Rio de Janeiro (1993–2006): topography, microbiological and clinical aspects

		Microbiological aspects			Clinical aspects		
					Gender (*n*)		
Topography	%	Pure culture or predominant growth in polymicrobial cultures	Age groups	No. strains	M	F	Underlying conditions (No. strains)
Urine	29·20	*Pure	Total	33	11	22	End-stage renal disease
			Adult	19	7	12	(14); haemodialysis (5);
			Aged	8	2	6	renal transplant (4)
			Infant	6	2	4	
Respiratory tract	27·45	Pure and polymicrobial	Total	31	18	13	
†Upper	12·90	Pure	Adult	4	1	3	
‡Lower	87·10	12·90% in association with	Adult	25	15	10	AIDS (6); *Mycobacterium*
		Haemophilus influenzae;	Aged	2	2	0	*tuberculosis* infection (2)
		Pseudomonas					
		aeruginosa and/or					
		Staphylococcus aureus					
Intravenous sites	18·60	Pure and polymicrobial	Total	21	11	7	
Blood	66·66	Pure	Adult	8	5	3	End-stage renal disease
			Infant	6			(3); cancer (1)
Catheter tips	33·33	9·53% in association with MRSA;	Adult	1	1	0	
		MRS and *Streptococcus* spp	Infant	3	2	1	
			Newborn	3	Unknown		NICU patients
Peritoneal fluid	4·42	Pure	Total	5	2	3	End-stage renal disease
			Adult	4	2	2	(3); haemodialysis (2);
			Aged	1	0	1	renal transplant (1); hepatic cirrhosis (1); AIDS (1)
Surgical wounds	4·42	Pure	Total	5	1	2	End-stage renal disease
			Adult	3	1	2	(1); haemodialysis (1)
			Newborn	2	Unknown		NICU patients
§Others	15·91	Pure	Total	18	7	4	
			Adult	10	6	0	
			Infant	1	1	0	
			Unknown	7			
					Unknown		

*$5{\cdot}0 \times 10^3$ CFU ml^{-1} (nephropathies) to $4{\cdot}0 \times 10^5$ CFU ml^{-1} (other cases).
†Nasopharyngeal infection (3) and cyst (1).
‡Lower respiratory tract (BAL, bronchoscopic samples and pleural fluid).
§Others, Ganglion/cervical necrosis (3), corneal/ocular secretion (2) ear secretion (3), synovial liquid (3) and unknown sites (7); Aged, ≥60 years-old; Adult at working age, 18 to ≤ 59 years-old; Infant, any child under the age of legal adulthood (<18 years of age); Newborn (0–7 days); NICU, neonatal intensive care unit patients; methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), methicillin-resistant *Staphylococcus* spp (MRS).

© 2009 The Authors

Urinary (29·2%) and respiratory (27·45%) tracts were the most frequent sources of *Coryne pseudodiphtheriticum* strains followed by intravenous sites (18·6%). Positive cultures were observed in 37 (32·7%) clinical specimens obtained from patients with at least one of the following predisposing conditions: end-stage renal disease (19 adults, one aged and one infant); renal transplant (three adults, one aged and one infant); AIDS (five adults, two aged) and *M. tuberculosis* infection (two aged); cancer (one adult), hepatic cirrhosis (one aged); neonatal intensive care (five newborns); haemodialysis (eight adults) and catheter use (one adult, three infants, three newborns).

Corynebacterium pseudodiphtheriticum strains were isolated from the urine of adults (58%), aged (24%) and infants (18%); mostly (67%) females. Interestingly, the pathogen was isolated from two noncontiguous organs (urine and cervical necrosis) of one patient, indicating the possibility of *Coryne pseudodiphtheriticum* disseminated infection.

Corynebacterium pseudodiphtheriticum were isolated from pulmonary samples of adults (25) and aged (two) patients, but not from infants and newborns; 22% with AIDS (two were also infected with *M. tuberculosis*); mostly (63%) males.

From 21 *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains isolated from intravenous sites, 67% were recovered from blood samples of adults (eight) and pediatric (six) patients; none from aged and neonates; three with end-stage renal disease and one with cancer. Seven catheter tips were found to be infected (≥15 colonies) by *Coryne. pseudodiphtheriticum*. Catheter-related infections were mostly (85·7%) observed in infants and newborns. Moreover, *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains were isolated from the peritoneal fluid of patients presenting predisposing conditions (four adults and one aged; three females). Five strains were isolated from surgical wounds of adults (two with end-stage renal disease and submitted to haemodialysis) and newborns.

Corynebacterium pseudodiphtheriticum susceptibility profiles to 19 antimicrobial agents are displayed in Table 2. All 113 clinical isolates were susceptible to both vancomycin and teicoplanin. Approximately 40% of the isolates were resistant to at least one of the antibiotics, with the exception of glycopeptides. Most of the strains (>50%) were resistant to oxacilin, erythromycin or clindamycin. Clindamycin was slightly more active *in vitro* than erythromycin. Resistance to penicillin and ampicillin ranged from 38·9% to 44·2%. Negative results for β-lactamase production evaluated by the nitrocefin-disc test were observed for all 113 strains tested.

Multiresistance to at least 10 antimicrobial agents (MR) was observed for 15·04% strains predominantly isolated from the urine (eight strains) followed by surgical wounds (three strains), lower respiratory tract (two strains), catheter tips (one strain) and peritoneal fluid (one strain). Five MR strains isolated from the urine (two), surgical wounds (one), lower respiratory tract (one) and peritoneal fluid (one) showed susceptibility only to vancomycin and teicoplanin.

Table 2 Resistance to antimicrobial agents exhibited by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains isolated from patients of a university hospital – Rio de Janeiro

Topographies (No. strains)	No. strains resistant to antimicrobial agents																
	PEN	OXA	AMP	FOX	CRO	CTX	CAZ	ERY	TET	CHL	GE	AMI	CLI	RIF	SXT	CIP	IMP
Urine (33)	16	20	16	16	15	15	17	19	14	15	12	14	20	13	14	14	14
Respiratory tract																	
Upper (4)	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	2	0	0	0	0
Lower (27)	7	8	8	15	8	10	8	15	14	9	14	9	15	15	14	12	11
Intravenous sites																	
Blood (14)	5	9	7	6	6	5	9	7	5	5	5	5	7	6	7	6	6
Catheter (7)	3	5	4	2	2	2	3	2	3	2	3	2	2	5	3	3	3
Surgical wounds (5)	4	4	4	2	3	2	3	3	4	3	4	4	4	4	4	3	4
Peritoneal fluid (5)	3	4	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	3	2	3
Others (18)	6	8	8	8	9	9	9	13	10	11	9	9	9	9	11	10	8
Total (113)	44	59	50	52	45	45	52	64	53	47	50	45	61	54	56	50	49
%	38·9	52·2	44·2	46·0	39·9	39·9	46·0	56·7	47·0	41·6	44·2	39·9	54·0	47·8	49·5	44·2	43·3

Others, Ganglion/cervical necrosis (3), corneal/ocular secretion (2) ear secretion (3), synovial liquid (3) and unknown sites (7); PEN, penicillin R ≥ 0·25 μg ml^{-1}; OXA, oxacillin R ≥ 4 μg ml^{-1}; AMP, ampicillin R ≥ 0·5 μg ml^{-1}; FOX, cefoxithin R ≥ 32 μg ml^{-1}; CRO, ceftriaxone R ≥ 64 μg ml^{-1}; CTX, cefotaxime R ≥ 64 μg ml^{-1}; CAZ, ceftazidime R ≥ 32 μg ml^{-1}; ERY, erythromycin R ≥ 8 μg ml^{-1}; TET, tetracycline R ≥ 16 μg ml^{-1}; CHL, chloramphenicol R ≥ 32 μg ml^{-1}; GEN, gentamicin R ≥ 8 μg ml^{-1}; AMK, amikacin 32 μg ml^{-1}; CLI, clindamycin R ≥ 4 μg ml^{-1}; RIF, rifampin R ≥ 4 μg ml^{-1}; STX, trimethoprim-sulfamethoxazole R ≥ 8/152 μg ml^{-1};.CIP, ciprofloxacin R ≥ 4 μg ml^{-1}; IMI, imipenen R ≥ 16 μg ml^{-1}. All strains were susceptible to vancomycin and teicoplanin.

© 2009 The Authors

Discussion

Corynebacterium pseudodiphtheriticum has been implicated as a cause of a variety of infections in severely immunocompromised patients for years. Cases of severe infections due to *Coryne. pseudodiphtheriticum* among the elderly have been increasingly reported (Morris and Guild 1991; Chiner *et al.* 1999; Li and Lal 2000; Chudnicka *et al.* 2003; Szmygin-Milanowska *et al.* 2003; Kemp *et al.* 2005). Thus, the significance of positive cultures for *Coryne. pseudodiphtheriticum* obtained from representative clinical samples of patients with signs and symptoms of bacterial infection should not be overlooked.

Despite significant differences in age and functional status of patients the pathogen was presently found distributed in various relevant topographies. Although *Coryne. pseudodiphtheriticum* was mostly recovered from adults of working age, similarly to previous observations in the literature (Ahmed *et al.* 1995; Gutierrez-Rodero *et al.* 1999), the pathogen was also isolated from patients of other age groups. Approximately 10% clinical isolates were obtained from the urine, lower respiratory tract and peritoneal fluid of aged patients.

Although only a few reported cases of infection were related with infants (<5 years of age) (LaRocco *et al.* 1987; Cimolai *et al.* 1992; Izurieta *et al.* 1997), in our study 14·15% *Coryne. pseudodiptheriticum* infections (urine, blood and catheter tips) were observed in infants <18 years of age. To date, no previous study, to our knowledge, has described infections due to *Coryne. pseudodiphtheriticum* in newborns. Interestingly, 4·42% strains were presently recovered from surgical wounds and catheter-related bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients.

Previous studies have observed a prevalence of *Coryne. pseudodiphtheriticum* infections in males (Ahmed *et al.* 1995; Gutierrez-Rodero *et al.* 1999). Presently, no differences were observed between genders. Nevertheless, when considered each site of infection separately, *Coryne. pseudodiphtheriticum* was mostly isolated from the urine and lower respiratory tract of females and males, respectively.

Contrary to data observed in industrialized countries, in our study *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains were mainly related with UTI. The pathogen was recovered not only from the urine samples of adults but also of elderly and infants. UTI related to *Coryne. pseudodiphtheriticum* was observed in patients without predisposing conditions. Predisposing conditions in UTI patients included end-stage renal disease, haemodialysis and renal transplant. Although *Coryne. pseudodiphtheriticum* has never been reported as a pathogen involved in abdominal cavity infection, five strains were recovered from the peritoneal fluid from elderly and adults with hepatic cirrhosis, end-stage renal disease or AIDS.

Only a few proportion of *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains (5·3%) were isolated from patients with AIDS. Micro-organisms were mainly recovered from BAL samples.

Corynebacterium pseudodiphtheriticum has seldom been reported as a skin pathogen recovered from surgical wounds, skin lesions and abscesses (Cantarelli *et al.* 2008). Presently, MR strains were related with surgical wounds in adults and neonatal intensive care unit patients. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* also seemed to be associated with lymphadenitis in adults. Only one case of rhinosinusitis was previously described (Voiriot *et al.* 1986). In our study, four *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains were isolated from the nasopharynx of adults with signs of infection or cyst.

Corynebacterium pseudodiphtheriticum was also isolated from ocular secretions. According to some authors, the significance of a positive culture in ocular surfaces should not be overlooked, as keratitis and conjunctivitis may be caused by *Coryne. pseudodiphtheriticum* (Li and Lal 2000).

The profiles of antimicrobial susceptibility of corynebacteria, including *Coryne pseudodiphtheriticum*, are not frequently predictable (Riegel *et al.* 1996; Lagrou *et al.* 1998; Soriano *et al.* 1998; Camello *et al.* 2003; Van Enk 2004). Except for the unvarying activity of vancomycin and teicoplanin against *Coryne. pseudodiphtheriticum*, the variability in resistance to other classes of antimicrobial agents emphasizes the need for the continuous surveillance of their resistance patterns.

Corynebacterium pseudodiphtheriticum is generally considered as susceptible to β-lactam agents, aminoglycosides, rifampin and vancomycin. Susceptibility to ciprofloxacin, lincomycin and tetracycline was found variable in the literature. Resistance to macrolides, clindamycin, trimethropim/sulphamethoxazole and chloramphenicol was observed in some opportunities (Gutierrez-Rodero *et al.* 1999; Chudnicka *et al.* 2003; Szmygin-Milanowska *et al.* 2003). The emergence of antimicrobial resistance among *Corynebacterium* species has also been described to penicillin and other β-lactam agents (Riegel *et al.* 1996; Lagrou *et al.* 1998; Soriano *et al.* 1998; Janda 1999; Camello *et al.* 2003). In the present study, the percentage of resistance to penicillin and ampicillin ranged from 38·9% to 44·2%. Resistance to oxacillin, a penicillin resistant to β-lactamases produced by Gram-positive cocci, reached 52·2%, suggesting a resistant pattern dependent on the modification of receptors to penicillin, as observed to penicillin-binding proteins from *Staphylococci* and *Streptococci*. Data were corroborated by the negative results for β-lactamase production of *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains. In accordance to resistance to penicillins, the

© 2009 The Authors

percentage of *Coryne. pseudodiphtheriticum* strains resistant to cephalosporins were as follows: 39·9% for ceftriaxone and cefotaxime; 46% for cefoxitin and ceftazidime. Resistance to imipenem was also observed for 43·3% of the isolates. Data suggest a cross-resistance pattern among β-lactam antibiotics displayed by *Coryne. pseudodiphtheriticum* clinical isolates. Although cefotaxime has been previously found effective in the therapy of nosocomial pneumonia caused by *Coryne. pseudodiphtheriticum*, in this study, 37% of the clinical isolates from the lower respiratory tract were resistant to cefotaxime.

Accordingly, additional data of pathogenicity of this organism to unexpected clinical sites and age groups contribute to the existing body of knowledge. Present information highlights the widening spectrum of *Coryne. pseudodiphtheriticum* infections and variable sensitivity to antibiotics. Moreover, we believe that the small number of cases in industrialized countries reported in the medical literature do not reflect the true incidence of *Coryne. pseudodiphtheriticum* in human infections worldwide, as universal screening for these organisms is not routine policy in many laboratories. Awareness among clinicians and microbiologists of the possible importance of these micro-organisms in metropolitan areas of emerging countries certainly will lead to an increase in number of reports.

Acknowledgements

This is work was supported by FAPERJ, CNPq, CAPES, SR-2/UERJ and Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX).

References

Ahmed, K., Kawakami, K., Watanabe, K., Mitsushima, H., Nagatake, T. and Matsumoto, K. (1995) *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis* **20**, 41–46.

Almuzara, M.N., De Mier, C., Rodriguez, C.R., Famiglietti, A.M. and Vay, C.A. (2006) Evaluation of API Coryne System, version 2.0 for diphtheroid gram-positive rods identification with clinical relevance. *Rev Argent Microbiol* **38**, 197–201.

Burke, G.J., Malouf, M.A. and Glanville, A.R. (1997) Opportunistic lung infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* after lung and heart transplantation. *Med J Aust* **166**, 362–364.

Camello, T.C.F., Mattos-Guaraldi, A.L., Formiga, L.C.D. and Marques, E.A. (2003) Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol* **34**, 39–44.

Cantarelli, V.V., Brodt, T.C., Secchi, C., Inamine, E. and Pereira, F.D. (2008) Cutaneous infection caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a microbiological report. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **50**, 51–52.

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.

Chiner, E., Arriero, J.M., Signes-Costa, J., Marco, J., Corral, J., Gomez-Esparrago, A., Ortiz, D.L.T. and Martin, V.C. (1999) *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunocompetent patient. *Monaldi Arch Chest Dis* **54**, 325–327.

Chudnicka, A., Szmygin-Milanowska, K., Kieszko, R., Milanowski, J. and Koziol-Montewka, M. (2003) The role of opportunistic species of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in the pathogenesis of CAP (Community Acquired Pneumonia). *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* **58**, 142–148.

Cimolai, N., Rogers, P. and Seear, M. (1992) *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonitis in a leukaemic child. *Thorax* **47**, 838–839.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (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). pp. 4–6. Wayne, Pennsylvania: CLSI.

Colt, H.G., Morris, J.F., Marston, B.J. and Sewell, D.L. (1991) Necrotizing tracheitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: unique case and review. *Rev Infect Dis* **13**, 73–76.

Funke, G. and Bernard, A.K. (2007) Coryneform Gram-positive rods. In *Manual of Clinical Microbiology* ed. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Pfaller, M.A. pp. 485–514. Washington DC, USA: ASM Press.

Gutierrez-Rodero, F., Ortiz, D.L., Martinez, V.C., Masia, M.M., Mora, A., Escolano, C., Gonzalez, E. and Martin-Hidalgo, A. (1999) *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: an easily missed respiratory pathogen in HIV-infected patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **33**, 209–216.

Izurieta, H.S., Strebel, P.M., Youngblood, T., Hollis, D.G. and Popovic, T. (1997) Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, a new challenge in the differential diagnosis of diphtheria. *Emerg Infect Dis* **3**, 65–68.

Janda, W.M. (1999) The *Corynebacteria* revisited: new species, identification kits, and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Newslett* **21**, 175–180.

Kemp, M., Holtz, K., Andresen, K. and Christensen, J.J. (2005) Demonstration by PCR and DNA sequencing of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a cause of joint infection and isolation of the same organism from a surface swab specimen from the patient. *J Med Microbiol* **54**, 689–691.

Lagrou, K., Verhaegen, J., Janssens, M., Wauters, G. and Verbist, L. (1998) Prospective study of catalase-positive

© 2009 The Authors

coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance and antibiotic susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis* **30**, 7–15.

LaRocco, M., Robinson, C. and Robinson, A. (1987) *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* associated with suppurative lymphadenitis. *Eur J Clin Microbiol* **6**, 79.

Li, A. and Lal, S. (2000) *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* keratitis and conjunctivitis: a case report. *Clin Exp Ophthalmol* **28**, 60–61.

Maki, D.G., Weise, C.E. and Sarafin, H.W. (1977) A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* **296**, 1305–1309.

Martinez-Martinez, L., Ortega, M.C. and Suarez, A.I. (1995) Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* **33**, 1318–1321.

Morris, A. and Guild, I. (1991) Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains. *Rev Infect Dis* **13**, 887–892.

Nathan, A.W., Turner, D.R., Aubrey, C., Cameron, J.S., Williams, D.G. and Ogg, C.S. (1982) *Corynebacterium hofmannii* infection after renal transplantation. *Clin Nephrol* **17**, 315–318.

Pimenta, F.P., Souza, M.C., Pereira, G.A., Hirata, R., Camello, T.C.F. and Mattos-Guaraldi, A.L. (2008) DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* **46**, 307–311.

Ramos, R.J.M., Ramirez, A.C. and Alemany, F.M.L. (1998) *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a new respiratory pathogen? Presentation of one case of acute suppurative tracheobronchitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **16**, 44–45.

Riegel, P., Ruimy, R., Christen, R. and Monteil, H. (1996) Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 657–662.

Soriano, F., Fernandez-Roblas, R., Calvo, R. and Garcia-Calvo, G. (1998) In vitro susceptibilities of aerobic and facultative non-spore-forming gram-positive bacilli to HMR 3647 (RU 66647) and 14 other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1028–1033.

Szmygin-Milanowska, K., Kieszko, R., Chudnicka, A. and Milanowski, J. (2003) Microbial etiologies in community acquired pneumonia (CAP). *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* **58**, 466–474.

Teixido, J., Arias, N., Tarrats, L. and Romero, R. (2007) The microbial pattern of the catheter exit-site infection in peritoneal dialysis: a non-diphtheria corynebacteria emergence? *Nefrologia* **27**, 350–358.

Thomson, R.B. Jr. (2007) Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In *Manual of Clinical Microbiology* ed. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Pfaller, M.A. pp. 485–514. Washington DC, USA: ASM Press.

Van Enk, R.A. (2004) Susceptibility testing of drugs and organisms not in NCCLS guidelines. *Clin Microbiol Newslett* **26**, 41–44.

Voiriot, P., Charlin, B., Marcoux, J.A. and Guirgis, H. (1986) Sub acute rhinosinusitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Can Med Assoc J* **134**, 1034–1035.

Weiss, K., Laverdière, M. and Rivest, R. (1996) Comparison of antimicrobial 2 susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion 3 methods. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 930–933.

© 2009 The Authors

Artigo 2 - Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells.

Autores: **Souza MC**, Santos LS, Gomes DL, Sabbadini PS, Santos CS, Camello TC, Asad LM, Rosa AC, Nagao PE, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL.

Revista: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012; 107: 486-93. (**Qualis A1)**

Resumo

Corynebacterium pseudodiphtheriticum é um patógeno humano bem conhecido que causa, principalmente, doença respiratória e está associado com elevada taxa de mortalidade em hospedeiros imunocomprometidos. Pouco se conhece sobre os fatores de virulência e patogênese de *C. pseudodiphtheriticum*. Neste estudo, culturas de células epiteliais humanas (HEp-2) foram utilizadas para analisar o padrão de aderência, a internalização e a sobrevivência intracelular da amostra padrão ATCC 10700 e dois isolados clínicos adicionais. Estes micro-organismos exibiram um padrão de aderência agregativa nas células HEp-2 caracterizado por aglomerados de bactérias com aparência de um "empilhado de tijolos". As diferenças na capacidade de invadir, sobreviver no interior de células HEp-2 e multiplicar no ambiente extracelular até 24 h após a infecção desses micro-organismos foram avaliadas. O ensaio de coloração de actina fluorescente demonstrou que a polimerização da actina está envolvida na internalização das amostras de *C. pseudodiphtheriticum*. A despolimerização de microfilamentos por citocalasina E reduziu significativamente a internalização de *C. pseudodiphtheriticum* nas células HEp-2. A Internalização bacteriana e o rearranjo do citoesqueleto parecem ser parcialmente provocados pela ativação da atividade da tirosina-quinase. Apesar das cepas de *C. pseudodiphtheriticum* não demonstrarem capacidade de replicar intracelularmente, as células HEp-2 não conseguiram eliminar completamente as bactérias viáveis do sobrenadante das monocamadas infectadas no prazo de 24 h. Estas características contrubuem para o esclarecimento de como algumas amostras de *C. pseudodiphtheriticum* podem causar infecção grave em pacientes humanos.

486 *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. *107*(4): 486-493, June 2012

Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells

Monica Cristina de Souza[1], Louisy Sanches dos Santos[1], Débora Leandro Rama Gomes[1,2], Priscila Soares Sabbadini[1,3], Cinta Silva dos Santos[1], Thereza Christina Ferreira Camello[1], Lídia Maria Buarque Oliveira Asad[4], Ana Claúdia de Paula Rosa[1], Prescilla Emy Nagao[5], Raphael Hirata Júnior[1], Ana Luiza de Mattos Guaraldi[1]/+

[1]Laboratório de Difteria e Corinebacterias de Importância Clínica, Faculdade de Ciências Médicas [4]Departamento de Biofísica e Biometria [5]Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil [2]Faculdade de Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil [3]Laboratório de Doenças Bacterianas Respiratórias e Sistêmicas, Centro Universitário do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

Corynebacterium pseudodiphtheriticum *is a well-known human pathogen that mainly causes respiratory disease and is associated with high mortality in compromised hosts. Little is known about the virulence factors and pathogenesis of* C. pseudodiphtheriticum. *In this study, cultured human epithelial (HEp-2) cells were used to analyse the adherence pattern, internalisation and intracellular survival of the ATCC 10700 type strain and two additional clinical isolates. These microorganisms exhibited an aggregative adherence-like pattern to HEp-2 cells characterised by clumps of bacteria with a "stacked-brick" appearance. The differences in the ability of these microorganisms to invade and survive within HEp-2 cells and replicate in the extracellular environment up to 24 h post infection were evaluated. The fluorescent actin staining test demonstrated that actin polymerisation is involved in the internalisation of the* C. pseudodiphtheriticum *strains. The depolymerisation of microfilaments by cytochalasin E significantly reduced the internalisation of C. pseudodiphtheriticum by HEp-2 cells. Bacterial internalisation and cytoskeletal rearrangement seemed to be partially triggered by the activation of tyrosine kinase activity. Although* C. pseudodiphtheriticum *strains did not demonstrate an ability to replicate intracellularly, HEp-2 cells were unable to fully clear the pathogen within 24 h. These characteristics may explain how some* C. pseudodiphtheriticum *strains cause severe infection in human patients.*

Key words: aggregative-like adherence pattern - *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* - HEp-2 cells - intracellular survival - persistence

Currently, more than half of all of the infectious diseases that affect mildly immunocompromised patients involve bacterial species that are commonly encountered in the environment or are found among the body's normal flora. Opportunistic pathogens, including *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, are frequently resistant to antimicrobial agents and there is no effective vaccine against this microbe. *C. pseudodiphtheriticum* has been reported to cause human disease in both immunocompromised and immunocompetent individuals, despite the fact that it is commonly found as a harmless commensal organism on the skin and in the upper respiratory tract (Ahmed et al. 1995, Burke et al. 1997, von Graevenitz et al. 1998, Camello et al. 2009, Martins et al. 2009, Bittar et al. 2010, Olender & Niemcewicz 2010). Infections caused by *C. pseudodiphtheriticum* include endocarditis (Morris & Guild 1991), bacteraemia (Das et al. 2003), pneumonia (Roig et al. 1993, Chiner et al. 1999, Martaresche et al. 1999, Chudnicka et al. 2003, Morinaga et al. 2010), tracheobronchitis (Craig et al. 1991), necrotising tracheitis (Colt et al. 1991), exudative pharyngitis (Izurieta et al. 1997) and rhinosinusitis (Voiriot et al. 1986), in addition to osteitis (Roux et al. 2004), arthritis (Kemp et al. 2005), suppurative lymphadenitis (LaRocco et al. 1987), conjunctivitis (Li & Lal 2000) and skin (Cantarelli et al. 2008) and urinary tract infections (Nathan et al. 1982).

Opportunistic pathogens may have an array of virulence factors that facilitate their attachment to host cells and enable tissue invasion. Recent advances in the understanding of the molecular biology of these organisms have shed considerable light on the ability of these pathogens to survive within host tissues and confer resistance to clearance by host immune mechanisms and antimicrobial agents (Odeh & Quinn 2000). Therefore, a better understanding of the biology and recognition of the virulent potential of *C. pseudodiphtheriticum* strains may help to effectively prevent the infections caused by them. To date, only one study has described the interaction of *C. pseudodiphtheriticum* with eukaryotic cells (Yanagawa & Honda 1976). The authors of that report showed that the *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700 strain possessed a large number of pili, ranging from

Financial support: CNPq, FAPERJ, SR-2/UERJ, PNPD (CNPq/CAPES), PAPD (FAPERJ/CAPES) and PRONEX/MCT
+ Corresponding author: guaraldi@uerj.br
Received 7 September 2011
Accepted 15 February 2012

dozens to more than a hundred, in 91-100% of the bacterial cells. However, the microorganism did not show the ability to agglutinate sheep erythrocytes, suggesting that some *C. pseudodiphtheriticum* strains exhibit a haemagglutination (HA)-negative phenotype, as previously observed for some strains of diphtheria bacilli (Mattos-Guaraldi & Formiga 1991). For some human pathogens, the (HA)-positive phenotype was reported to be more virulent than the non-haemadherent phenotype (Kang et al. 2002). Additional studies are necessary to investigate whether *C. pseudodiphtheriticum* strains that have the (HA)-positive phenotype exist and, if so, to what extent they are involved in human infections.

In this study, we investigated the adherence pattern, invasion, intracellular survival and persistence of *C. pseudodiphtheriticum* within human epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions - The *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700 type strain, isolated from exudative pharyngitis (Izurieta et al. 1997) and two clinical isolates previously obtained from patients (Camello et al. 2009, Martins et al. 2009) that were treated at a teaching hospital in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil were used in these experiments. The clinical strains included the HTR1503 strain, which was isolated from the bronchoalveolar lavage (BAL) of a patient with pneumonia, and the HHC1507 strain, which was isolated from a blood sample of a patient with bacteraemia. The microorganism identification originally conducted using conventional biochemical tests (Funke & Bernard 2007, Camello et al. 2009) was reconfirmed by the use of the API-Coryne System (bioMérieux, Lyon, France), according to the manufacturer's instructions, using several profiles: 1001004, 3001004 and 3001004 (all probabilities > 90%) (Almuzara et al. 2006). Stock cultures were maintained in 10% skim milk containing 25% glycerol at -80°C.

All experiments were conducted with microorganisms grown in trypticase soy broth for 48 h at 37°C and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M; pH 7.2) (Hirata Jr et al. 2002).

Haemagglutination (HA) - HA assays were performed with 0.5% suspensions of human B erythrocytes, as previously described for Corynebacterium diphtheriae. The CDC E-8392 and TR241 strains were used as positive and negative controls, respectively (Mattos-Guaraldi et al. 1991).

Qualitative and quantitative human epithelial (HEp-2) adherence, invasion and persistence assays - HEp-2 cells, derived from a human epidermoid larynx carcinoma, were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) (Sigma Chemical Co, MO, USA) supplemented with 5% foetal calf serum (FCS) (Gibco BRL, NY, USA), 50 µg mL^{-1} gentamicin, 2.5 µg mL^{-1} amphotericin B and 0.5% L-glutamine at 37°C, in a 5% CO_2 atmosphere.

Adherence assays were performed with semi-confluent HEp-2 monolayers grown on circular cover slips (13 mm diameter). At 3 h post-infection, Giemsa-stained cover slips were examined by bright field microscopy. Microorganisms were evaluated for their ability to demonstrate the following adherence patterns: localised adherence (LA), characterised by small clusters of bacteria resembling microcolonies, diffuse adherence (DA), characterised by bacteria randomly distributed over the surfaces of the HEp-2 cells, or aggregative adherence (AA), characterised by clumps of bacteria with a "stacked-brick" appearance. *C. diphtheriae* CDC E-8392, TR241 and HC01 strains were used as controls for DA, LA and AA-like adherence patterns, respectively (Hirata Jr et al. 2004, 2008).

Bacterial viable counts were performed using monolayers of HEp-2 cells grown to approximately 95% confluence and infected with C. pseudodiphtheriticum [10^6-10^7 colony-forming unit (CFU) mL^{-1}] suspended in MEM [multiplicity of infection (MOI) of 10]. After incubation periods of 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h and 24 h, infected HEp-2 cells were washed six times, lysed with 0.1% Triton X-100 in PBS and diluted and plated onto Columbia agar base (Hirata Jr et al. 2002, 2004).

To determine the intracellular viable bacteria (IC) counts, monolayers were washed six times with PBS and treated with 150 µg mL^{-1} gentamicin sulphate for 1 h. The number of IC was determined after lysis of the monolayers with 250 µL of 0.1% Triton X-100 in PBS. For each incubation period, the percentage of intracellular bacteria was deduced from the number of HEp-2 cell-associated bacteria. Index values of the IC related to bacteria associated with HEp-2 cell monolayers were also determined (Hirata Jr et al. 2002, 2004, Moreira et al. 2003). The bacterial counts (CFU) in supernatants and HEp-2 monolayer lysates were determined at each incubation period. The percentage of cell-associated bacteria (EC + IC) at each incubation period was calculated as follows: lysate CFU × (lysate CFU + supernatant CFU)$^{-1}$ × 100 (Moreira et al. 2003).

To evaluate bacterial persistence, viable bacteria were recovered from the lysates of monolayers maintained in the presence of gentamicin for 24 h (T24P). Briefly, the monolayers were washed six times with PBS at 3 h post-infection and subsequently treated with 150 µg mL^{-1} gentamicin sulphate for 24 h. The persistence of intracellular bacteria was determined by viable counts (CFU mL^{-1}) conducted after the monolayers were lysed with 250 µL of 0.1% Triton X-100 in PBS at 24 h post-infection (Döpfer et al. 2001).

Fluorescent actin staining (FAS) test - Semi-confluent HEp-2 monolayers were infected with the bacterial strains. After 3 h of incubation, infected cells were rinsed six times with PBS, fixed for 15 min with 3% formaldehyde and then treated with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Monolayers were washed three times with PBS and treated with 5 µg mL^{-1} fluorescein-conjugated phalloidin (Sigma) for 30 min. FAS test results were considered positive when foci of intense fluorescence corresponded to areas of bacterial adhesion observed under phase-contrast microscopy (Hirata Jr et al. 2004). The *C. diphtheriae* CDC E-8392 strain was used as a positive control (data not shown).

Treatment of HEp-2 cells with cytochalasin E and genistein - HEp-2 monolayers were pre-treated with 5 µM cytochalasin E and 100 µM genistein (both pur-

chased from Sigma) in MEM for 30 min and washed twice before bacterial infection. The percentages of cell-associated and IC were determined as described above (Hirata Jr et al. 2004).

Statistical analysis - Each experiment was carried out in triplicate and repeated three times. Statistical analysis was performed using Tukey's test in GraphPad Prism software to compare the means of the experimental groups; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

HA - None of the microorganisms we tested were able to agglutinate human erythrocytes, including the fimbriated ATCC 10700 type strain (data not shown).

Adherence, entry and survival of *C. pseudodiphtheriticum* strains in HEp-2 cells - The microscopic examination of HEp-2 epithelial cells infected with *C. pseudodiphtheriticum* revealed an AA-like adherence pattern characterised by clumps of bacteria with a "stacked-brick" appearance (3 h), as illustrated in Fig. 1. Microorganisms were also attached to the surfaces of the cultured epithelial cells at focal points and to exposed areas of the glass slide around the HEp-2 cells. HEp-2 cells that were infected with *C. pseudodiphtheriticum* showed large cytoplasmic vacuoles.

The results of the quantitative cell-associated bacteria (EC + IC) and IC tests at different incubation times are shown in Table I. *C. pseudodiphtheriticum* strains were able to adhere to and survive within HEp-2 cells at different levels at the specified periods of incubation. Viable cell-associated bacteria were detected at 30 min post-infection. The highest percentages of associated bacteria were observed at 6 h post-infection. Viable associated bacteria were detected at different levels at 24 h post-infection for the ATCC 10700/pharyngitis (15.13%) and HTR1503/pneumonia (51.90%) strains, except for the HHC1507/bacteraemia strain.

Viable internalised bacteria were initially detected at 3 h post-infection of the monolayers, regardless of the origin of the *C. pseudodiphtheriticum* strain. The highest percentages of viable intracellular bacteria deduced from HEp-2 cell-associated bacteria were observed at 6 h post-infection for the HHC1507/bacteraemia (3.43%) and ATCC 10700/pharyngitis (3.23%) strains. The ATCC 10700/pharyngitis strain showed an average ratio of viable intracellular bacteria to bacteria associated with HEp-2 cell monolayers of 1:10, while the HHC1507/bacteraemia and HTR1503/pneumonia strains exhibited ratios of 1:38 and 1:54, respectively.

Although all strains tested were able to adhere to and survive within HEp-2 cells until 6 h post-infection, the ATCC 10700/pharyngitis type strain exhibited greater survival (44.82%) within HEp-2 cells at 24 h post infection than did the HTR1503 (pneumonia) strain (0.38%) (Table I). For the HHC1507 strain (bacteraemia), viable bacterial cells were only observed in the supernatant of infected HEp-2 cells at 24 h post-infection (Table II).

Bacterial persistence following a longer period of infection (24 h) - The results of the experiments on the intracellular survival and persistence of *C. pseudodiphtheriticum* strains at 24 h post-infection are shown in Table II. *C. pseudodiphtheriticum* strains were able to survive in the presence of HEp-2 cells at different levels until 24 h post-infection. Bacterial growth in the extracellular environment after this long period of incubation (24 h) was observed only for the ATCC 10700/pharyngitis type strain. The intracellular persistence of bacteria at 24 h post infection was observed for both the *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700/pharyngitis type strain and the HTR1503/pneumonia strains ($p > 0.05$), but not for the HHC1507/bacteraemia strain. The clinical isolates were unable to replicate intracellularly under the experimental conditions that were used.

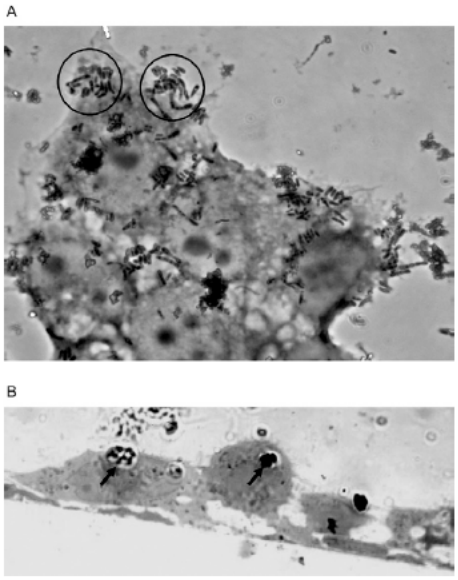

Fig. 1: light micrographs illustrating the aggregative (AA)-like adherence pattern to human epithelial (HEp-2) cells (3 h) of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (HHC1507 strain). AA-like adherence pattern was characterized by clumps of bacteria with a "stacked-brick" appearance (circles) (A); bacterial aggregates of ATCC 10700 strain when adherent to and internalized within loose vacuoles by HEp-2 cells (6 h) (B). Magnification: 1,000X.

The evaluation of the cytoskeletal rearrangements accompanying the adherence and entry of C. pseudodiphtheriticum into HEp-2 cells - As shown by the FAS test, *C. pseudodiphtheriticum* was able to trigger actin polymerisation in HEp-2 cells (Fig. 2). The accumulation of polymerised actin was observed directly beneath the adherent bacteria.

The results exhibited in Fig. 3 show that the internalisation of the *C. pseudodiphtheriticum* HHC1507/bacteraemia and HTR1503/pneumonia strains was completely inhibited by cytochalasin E. The adhesion of the HHC1507/bacteraemia strain to HEp-2 cells was also

TABLE I

Corynebacterium pseudodiphtheriticum viable cells associated to and internalized by human epithelial (HEp-2) epithelial cells at different periods of incubation

	Viable bacteria					
	ATCC 10700/ exudative pharyngitis		HTR1503/ pneumonia		HHC1507/ bacteraemia	
Time (h)	EC + IC (%)	IC (%)	EC + IC (%)	IC (%)	EC + IC (%)	IC (%)
T0.5S	10.51[a]	0	31.16[d]	0	4.41	0
T1S	43.30	0	16.36	0	43.92[f]	0
T3S	56[b]	3.23[c]	31.31[d]	0.65	44.36[f]	0.36
T6S	53.70[b]	3.23[c]	51.15[e]	1.70	48.83	3.43
T24S	15.13[a]	44.82	51.90[e]	0.38	0	0

a-f: results of comparative analysis presenting $p > 0.05$. EC + IC: extracellular + intracellular (viable bacteria associated to HEp-2 cells); IC: viable associated bacteria found in cell lysates obtained from monolayers previously treated with gentamicin (1 h). Means of three experiments and repeated three times. $p < 0.05$ considered statistically significant.

TABLE II

Survival (T24S) and persistence (T24P) of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains at 24 h post infection of human epithelial (HEp-2) epithelial cells[a]

	Viable bacteria (colony-forming unit mL^{-1})					
	ATCC 10700/ exudative pharyngitis		HTR1503/ pneumonia		HHC1507/ bacteremia	
	SN	IC	SN	IC	SN	IC
T0	8.7×10^6	-	6.7×10^6	-	16×10^6	-
T24S	1.27×10^7	$1.07 \times 10^{7\,b}$	3.0×10^6	$1 \times 10^{6\,c}$	9×10^5	0
T24P	0	$1 \times 10^{4\,b}$	0	$1 \times 10^{4\,b}$	0	0

a: bacterial inoculums of ~8×10^6 bacteria; *b, c*: results of comparative analysis considering $p > 0.05$; IC: viable bacteria recovered at 24 h post-infection from lysates of monolayers previously treated (1 h) with gentamicin (T24S) and maintained in the presence gentamicin (T24P); SN: viable bacteria recovered from the supernatants of infected monolayers. Means of three experiments and repeated three time. $p < 0.05$ considered statistically significant.

completely inhibited by blocking actin polymerisation. For the HTR1503/pneumonia strain, the inhibition of internalisation led to a greater deposition of bacteria on the surfaces of cytochalasin E treated cells. These data indicate that actin-dependent mechanisms are involved in the adherence and internalisation of the HHC1507 strain. In contrast, distinct mechanisms could account for the adherence and internalisation of the HTR1503 strain. An actin-dependent mechanism seemed to be involved in the internalisation, but not the adherence, of the invasive HTR1503 strain.

For the ATCC 10700-type strain, cytochalasin did not completely inhibit bacterial adherence or invasion, suggesting that actin-independent mechanisms contribute both processes.

To investigate whether the adherence and invasion processes involved actin polymerisation via a phosphotyrosine-signalling cascade, the bacterial interaction with HEp-2 cells was evaluated in the presence of genistein, a tyrosine kinase inhibitor. The data indicate that the *C. pseudodiphtheriticum* adherence and invasion processes involve actin polymerisation via a phosphotyrosine-signalling cascade in different ways.

The adherence processes of the ATCC 10700 and HHC1507 strains involved actin polymerisation via a phosphotyrosine-signalling cascade at different levels ($p < 0.05$). The inhibitory effect of genistein on internalisation was significant for ATCC 10700 ($p < 0.001$) and HTR1503 ($p < 0.05$) strains. Conversely, the inhibition of the phosphotyrosine-signalling cascade led to a

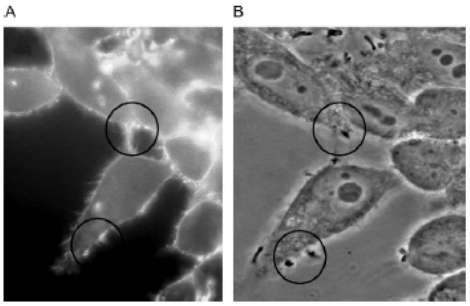

Fig. 2: fluorescence (A) and phase-contrast microscopy (B) showing positive fluorescent actin staining (FAS) test of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Foci of intense fluorescence corresponded to areas of bacterial adhesion observed under phase-contrast. Micrographs of control strains *Escherichia coli* E2348/69 (FAS-positive) and *E. coli* DH5-α (FAS-negative) were not shown. Magnification: 1,000X.

significant ($p < 0.001$) increase in the number of viable intracellular bacteria of the HHC 1507 strain.

The inhibition of tyrosine kinases did not influence the adherence of HTR1503 and only partially reduced the internalisation of the ATCC 10700 and HTR1503 strains. In contrast to the ATCC 10700 strain, the data suggest that the HHC1507 strain has an invasion process that involves actin polymerisation, but is largely independent of phosphotyrosine signalling.

Although the adherence and invasion of *C. pseudodiphtheriticum* involved actin polymerisation via a phosphotyrosine-signalling cascade, the data also suggest that some strains may be able to trigger actin polymerisation in HEp-2 cells independent of phosphotyrosine signalling. The data also suggest that microfilament-independent mechanisms are triggered during the adherence, entry and intracellular survival of some *C. pseudodiphtheriticum* strains in cultured human respiratory epithelial cells.

DISCUSSION

The behaviour of a microorganism within epithelial cells provides some insight into its overall pathogenic strategy. Bacterial adherence to mucosal and epithelial cell structures is important not only for microbial persistence in the airways, but also for its systemic dissemination (Riise et al. 2000). Moreover, the internalisation of bacteria by epithelial cells indicates that such species have developed specialised mechanisms that co-opt normal host cell functions and stimulate their own uptake and adaptation to the intracellular environment (Meyer et al. 1997). Infectious organisms are frequently introduced into the cell by endocytosis. Cytoplasmic vacuolisation and degradation suggest the death of infected cells, which could provide a route for the dissemination of microorganisms to distal sites, where foci of metastatic infection could be established (Henics & Wheatley 1999). Previous studies have shown that diphtheria bacilli can enter epithelial cells through an intimate adherence to the cell membranes, as well as the presence of the bacteria inside vacuoles. Here, we showed that during the invasion of HEp-2 cells, numerous *C. pseudodiphtheriticum* bacteria are present within a single membrane-bound vacuole, concomitant with epithelial cell detachment. These mechanisms may be relevant for in vivo infections, allowing *C. pseudodiphtheriticum* to breach the epithelial cell barrier and enter deeper tissues.

In this study, *C. pseudodiphtheriticum* strains associated with human infection showed variations in their abilities to replicate in the extracellular environment and survive in the presence of HEp-2 cells. Our data also suggest that *C. pseudodiphtheriticum* not only multiplies at and remains on the surface of the host, but also may use its attachment to epithelial cells as an essential step to reach to deeper tissues or to other sites.

During infection, many pathogenic bacteria modulate the actin cytoskeleton of eukaryotic host cells to facilitate various infectious processes, such as the attachment to or invasion of epithelial cells. The much-studied enteropathogenic bacteria primarily usurp host cell microfilaments for entry (Chu & Lu 2005). Entry into non-phagocytic cells involves a triggering of host signal transduction mechanisms to induce rearrangements of the host cytoskeleton, thereby facilitating bacterial cell uptake. Activation of the tyrosine kinase activity is a common feature in the signal transduction pathways that lead to the internalisation of invasive pathogens (Finlay et al. 1991, Tan et al. 1998).

In the invasion process of *C. pseudodiphtheriticum,* the binding of the bacterium triggers a signal in the epithelial cell that causes the re-organisation of the cytoskeleton components that surround the organism and provide the force necessary for bacterial uptake. However, *C. pseudodiphtheriticum* strains showed varying abilities to trigger host signal transduction mechanisms to induce such rearrangements of the host cytoskeleton during their invasion processes. Cytoskeletal rearrangement appeared to be partially triggered by activation of tyrosine kinases. Moreover, some strains of *C. pseudodiphtheriticum* may generate microfilament-independent pathways for bacterial uptake, as previously observed among other human pathogens (Meyer et al. 1997).

The adhesion to and intracellular persistence within HEp-2 cells were high in the piliated *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700 strain. Unlike *C. diphtheriae* (Mattos-Guaraldi & Formiga 1991), the *C. pseudodiphtheriticum* strains evaluated in this study were unable to agglutinate human erythrocytes. Therefore, the pilins of the *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700 type strain were unable to function as erythrocyte agglutinins in sheep (Yanagawa & Honda 1976) and humans. The observed differences in the ability of these strains to adhere, enter and survive within host cells suggest a qualitative and/or quantitative diversity in the expression of the bacterial components that function as adhesin(s) and/or invasin(s).

In several studies, opportunistic and true pathogens have been classified based on their adherence patterns to tissue culture cells. The AA pattern of adhesion was recognised in *Klebsiella pneumoniae* strains that are associated with neonatal colitis in a nosocomial environment (Livrelli et al. 1996). For diarrhoeagenic *Es-*

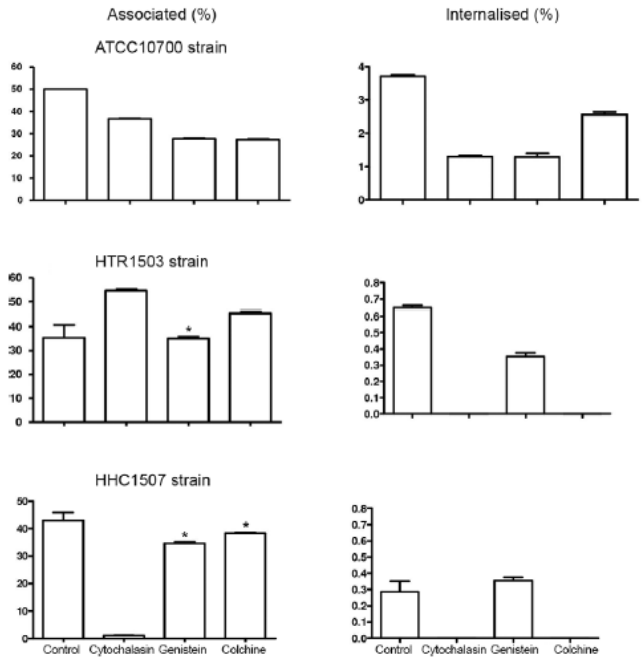

Fig. 3: effect of pre-treatment of human epithelial (HEp-2) cells with cytochalasin E, genistein and colchicine inhibition assays on adherence and entry of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* ATCC 10700, HTR1503 and HC1507 strains at 3 h post-infection. Each experiment was carried out in triplicate and repeated three times. Asterisk means $p > 0.05$.

cherichia coli, the association of adhesion patterns with different clinical syndromes has been well established (Nataro & Kaper 1998). Recently, the AA properties of cultured epithelial cells were associated with the invasiveness and intracellular survival of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (Pereira et al. 2008) and *C. diphtheriae* (Hirata Jr et al. 2008) strains. All of the *C. pseudodiphtheriticum* strains tested were different from diphtheria bacilli and showed an AA-like pattern, regardless of the origin of the isolate. Similarly to EAEC, two *C. pseudodiphtheriticum* clinical isolates (ATCC10700/exudative pharyngitis and HTR1503/pneumonia) exhibited AA-like adhesive properties associated with invasiveness and intracellular persistence. The AA-like HHC1507/bacteraemia strain was unable to persist in the intracellular compartment; viable bacteria were observed only in the supernatants. These data suggest differences in the virulence mechanisms of the various *C. pseudodiphtheriticum* strains.

Extracellular pathogens, such as uropathogenic *E. coli* (Mulvey et al. 2001) and *Helicobacter pylori* (Necchi et al. 2007), have been shown to transiently colonise the intracellular environment of the mucosal epithelia as a strategy for long-term persistence. Similarly, the ability of bacteria to survive within host cells may serve to intensify the pathogenicity of *C. pseudodiphtheriticum*. The utilisation of the intracellular space by *C. pseudodiphtheriticum* could be a means of survival under adverse extracellular conditions. The microorganisms tested were differentially able to enter and persist for long periods within epithelial cells from the human larynx. Investigations are just beginning to uncover the processes used by *C. pseudodiphtheriticum* to invade epithelial cells and breach the blood barrier. It is already clear that the processes used by this "opportunistic" bacterium mimic those used by a group of well-known invasive human pathogens. Our results suggest that epithelial cells may play a role in the dissemination of some *C. pseudodiphtheriticum* strains throughout the respiratory tract and other sites in the human body.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Noemia Rodrigues Gonçalves Alves and Maria Angélica Pereira da Silva, for technical assistance.

REFERENCES

Ahmed K, Kawakami K, Watanabe K, Mitsushima H, Nagatake T, Matsumoto K 1995. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis 20*: 41-46.

Almuzara MN, De Mier C, Rodriguez CR, Famiglietti AM, Vay CA 2006. Evaluation of API Coryne System, version 2.0, for diph-

theroid gram-positive rods identification with clinical relevance. *Rev Argent Microbiol 38*: 197-201.

Bittar F, Cassagne C, Bosdure E, Stremler N, Dubus JC, Sarles J, Reynaud-Gaubert M, Raoult D, Rolain JM 2010. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. *Emerg Infect Dis 16*: 1231-1236.

Burke GJ, Malouf MA, Glanville AR 1997. Opportunistic lung infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* after lung and heart transplantation. *Med J Aust 166*: 362-364.

Camello TCF, Souza MC, Martins CA, 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.

Cantarelli VV, Brodt TC, Secchi C, Inamine E, Pereira FS 2008. Cutaneous infection caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a microbiological report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo 50*: 51-52.

Chiner E, Arriero JM, Signes-Costa J, Marco J, Corral J, Gomez-Esparrago A, Ortiz TV, Martin C 1999. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunocompetent patient. *Monaldi Arch Chest Dis 54*: 325-327.

Chu WH, Lu CP 2005. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of EPC cells by *Aeromonas hydrophila*. *J Vet Med B 52*: 180-182.

Chudnicka A, Szmygin-Milanowska K, Kieszko R, Milanowski J, Koziol-Montewka M 2003. The role of opportunistic species of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in the pathogenesis of CAP (community acquired pneumonia). *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med 58*: 142-148.

Colt HG, Morris JF, Marston BJ, Sewell DL 1991. Necrotizing tracheitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: unique case and review. *Rev Infect Dis 13*: 73-76.

Craig TJ, Maguire FE, Wallace MR 1991. Tracheobronchitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *South Med J 84*: 504-506.

Das BB, Schnell P, Mendez H 2003. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* bacteremia in an immunocompetent adolescent: a case report an review of literature. *Eastern J Med 8*: 18-19.

Döpfer D, Nederbragt H, Almeida RA, Gaastra W 2001. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol 80*: 285-296.

Finlay BB, Ruschkowsk S, Dedhar S 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J Cell Sci 99*: 283-296.

Funke G, Bernard AK 2007. Coryneform Gram-positive rods. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller (eds.), *Manual of clinical microbiology*, ASM Press, Washington DC, p. 485-514.

Henics T, Wheatley DN 1999. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. *Biol Cell 91*: 485-498.

Hirata Jr R, Napoleão F, Monteiro-Leal LH, Andrade AF, Nagao PE, Formiga LC, Fonseca LS, Mattos-Guaraldi AL 2002. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett 215*: 115-119.

Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DL, Damasco PV, Rosa AC, Nagao PE, Pimenta FP, Mattos-Guaraldi AL 2008. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz J Med Biol Res 41*: 986-991.

Hirata Jr R, Souza SM, Rocha-de-Souza CM, Andrade AF, Monteiro-Leal LH, Formiga LCD, Mattos-Guaraldi AL 2004. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microb Pathog 36*: 125-130.

Izurieta HS, Strebel PM, Youngblood T, Hollis DG, Popovic T 1997. Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, a new challenge in the differential diagnosis of diphtheria. *Emerg Infect Dis 3*: 65-68.

Kang MS, Gazdzinski P, Kleven SH 2002. Virulence of recent isolates of *Mycoplasma synoviae* in Turkeys. *Avian Diseases 46*: 102-110.

Kemp M, Holtz K, Andresen K, Christensen JJ 2005. Demonstration by PCR and DNA sequencing of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a cause of joint infection and isolation of the same organism from a surface swab specimen from the patient. *J Med Microbiol 54*: 689-691.

LaRocco M, Robinson C, Robinson A 1987. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* associated with suppurative lymphadenitis. *Eur J Clin Microbiol 6*: 79.

Li A, Lal S 2000. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* keratitis and conjunctivitis: a case report. *Clin Exp Ophthalmol 28*: 60-61.

Livrelli V, De Champs C, Di Martino P, Darfeuille-Michaud A, Forestier C, Joly B 1996. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella, Enterobacter* and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol 34*: 1963-1969.

Martaresche C, Fournier PE, Jacomo V, Gainnier M, Boussuge A, Drancourt M 1999. A case of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis 5*: 722-723.

Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E, Hirata Jr R, Thuler LCS, Mattos-Guaraldi AL 2009. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz 104*: 905-913.

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

Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM 1997. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med 8*: 389-409.

Moreira LO, Andrade AF, Vale MD, Souza SM, Hirata Jr R, Asad LM, Asad NR, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Mattos-Guaraldi AL 2003. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl Environ Microbiol 69*: 5907-5913.

Morinaga Y, Yanagihara K, Yamada K, Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Inoue Y, Kamihira S, Kohno S 2010. Two cases of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* respiratory tract infection. *Kansenshogaku Zasshi 84*: 65-68.

Morris A, Guild I 1991. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review and antibiotic susceptibilities of nine strains. *Rev Infect Dis 13*: 887-892.

Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun 69*: 4572-4579.

Nataro JP, Kaper JB 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev 11*: 142-201.

Nathan AW, Turner DR, Aubrey C, Cameron JS, Williams DG, Ogg CS, Bewick M 1982. *Corynebacterium hofmannii* infection after renal transplantation. *Clin Nephrol 17*: 315-318.

Necchi V, Candusso ME, Tava F, Lunetti O, Ventura U, Fiocca R 2007. Intracellular, intercellular and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplasic lesions and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology 132*: 1009-1023.

Odeh R, Quinn JP 2000. Problem pulmonary pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*. *Semin Respir Crit Care Med 21*: 331-339.

Olender A, Niemcewicz M 2010. Macrolide, lincosamide and streptogramin B-constitutive-type resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from upper respiratory tract specimens. *Microb Drug Resist 16*: 119-122.

Pereira ACM, Britto-Filho JD, Carvalho JJ, Luna MG, Rosa ACP 2008. *Escherichia coli* enteroaggregative (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microb Pathog 45*: 310-314.

Riise GC, Qvarfordt I, Larsson S, Eliasson V, Andersson BA 2000. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells *in vitro*. *Respiration 67*: 552-558.

Roig P, Lopez MM, Arriero JM, Cuadrado JM, Martin C 1993. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in a patient diagnosed with HIV infection. *An Med Interna 10*: 499-500.

Roux V, Drancourt M, Stein A, Riegel P, Raoult D, La Scola B 2004. *Corynebacterium* species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene sequence analysis. *J Clin Microbiol 42*: 2231-2233.

Tan E, Low KW, Wong WSF, Leung Y 1998. Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with tyrosine kinase inhibitor. *Microbiology 144*: 299-307.

Voiriot P, Charlin B, Marcoux JA, Guirgis H 1986. Subacute rhinosinusitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *CMAJ 134*: 1034-1035.

von Graevenitz A, Punter-Streit V, Riegel P, Funke G 1998. Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals. *J Clin Microbiol 36*: 2087-2088.

Yanagawa R, Honda E 1976. Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. *Infect Immun 13*: 1293-1295.

Artigo 3: Biofilm formation and binding activities to fibrinogen and fibronectin by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum.*

Autores: Souza MC, Ramos JN, Santos LS, Sousa LP, Ssbbadini PS, Santos CS, Nagao PE, Vieira VV, Gomes DLR, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL.

Revista: *BMC Microbiology*. (**Submetido) (Qualis A1)**

Resumo

As infecções relacionadas a biofilme são as principais causas de morbidade e mortalidade. Os biofilmes concedem a vários patógenos bacterianos a capacidade de se tornarem colonizadores persistentes, de melhorar a sua resistência aos antibióticos e o intercâmbio de material genético. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, um micro-organismo comensal da pele e trato respiratório superior, tem sido cada vez mais resistente a agentes antimicrobianos e responsável por graves infecções nosocomiais. No entanto, os fatores de virulência de *C. pseudodiphtheriticum* e seus mecanismos de ação ainda não estão claros. Neste estudo relatamos as propriedades adesivas e formação de biofilme sobre as superfícies abióticas hidrofílicas (vidro) e hidrofóbicas (plástico) de amostras de *C. pseudodiphtheriticum* isoladas de pacientes com infecções localizada (ATCC10700/Faringite) e sistêmica (HHC1507/Bacteremia). A adesão ao poliestireno atribuída às interações hidrofóbicas entre as células bacterianas e a esta superfície carregada negativamente indicaram o envolvimento de hidrofobicidade da superfície celular na fase inicial da formação de biofilmes. Subsequentemente, os micro-organismos ligados e multiplicados formaram microcolônias acumuladas como agrupamentos de células em várias camadas, um passo que envolveu a adesão intercelular e a síntese de moléculas de matriz extracelular. O crescimento adicional conduziu à formação de agregados bacterianos densos incorporados na matriz exopolimérica rodeado por uma rede de canais, típicas de biofilmes maduros. Os dados também mostraram que *C. pseudodiphtheriticum* interage com fibrinogênio humano (Fbg), fibronectina (Fn) humana e o envolvimento destes componentes séricos na formação de biofilme. Estas descobertas sugerem que a formação de biofilme pode estar associada com a expressão de adesinas diferentes, conforme atualmente demonstrado na formação de biofilme aderente de crescimento *in vitro* em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas abióticas. A

afinidade para Fbg, Fn e a capacidade de formação de biofilme pode contribuir para o estabelecimento e disseminação da infecção causada por *C. pseudodiphtheriticum*.

Title Page

Biofilm formation and binding activities to fibrinogen and fibronectin by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

Monica Cristina Souza[1*], Juliana Nunes Ramos[1,3*], Louisy Sanches dos Santos[1*], Leonardo Paiva Sousa[1], Priscila Soares Sabbadini[1,5], Cíntia da Silva Santos[1], Prescilla Emy Nagao Ferreira[2], Verônica Viana Vieira[3], Débora Leandro Rama Gomes[1,4], Raphael Hirata Júnior[1], Ana Luiza Mattos-Guaraldi[1]*

[1] Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas. Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

[2] Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

[3] Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Departamento de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

[4] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[5]Laboratório de Doenças Bacterianas Respiratórias e Sistêmicas, Centro Universitário do Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

Key words: Corynebacterium pseudodiphtheriticum, fibrinogen, fibronectin, biofilm.

Running title: Fbg/Fn binding activities and biofilm formation

---

**Corresponding author*: Dr. Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar. Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ 20.551-030, Brazil. E-mail: guaraldi@uerj.br

Abstract

Background: Biofilm-related infections a major cause of morbidity and mortality. Biofilms allow several bacterial pathogens to become persistent colonizers, enhance their resistance to antibiotics and exchange genetic material. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum,* a commensal microorganism on the skin and upper respiratory tract, has been progressively more resistance to antimicrobial agents and responsible for severe nosocomial infections. However, *C. pseudodiphtheriticum* virulence factors and their mechanisms of action remain unclear. **Results**: Herein, we report the adhesive properties and biofilm formation on hydrophilic (glass) and hydrophobic (plastic) abiotic surfaces by *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from patients with localized (ATCC10700/Pharyngitis) and systemic (HHC1507/Bacteremia) infections. Adherence to polystyrene attributed to hydrophobic interactions between bacterial cells and this negatively charged surface indicated the involvement of cell surface hydrophobicity in the initial stage of biofilm formation. Subsequently, the attached microorganisms multiplied and formed microcolonies that accumulated as multilayered cell clusters, a step that involved intercellular adhesion and synthesis of extracellular matrix molecules. Further growth led to the formation of dense bacterial aggregates embedded in the exopolymeric matrix surrounded by voids, typical of mature biofilms. Data also showed *C. pseudodiphtheriticum* recognizing human fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) and involvement of these sera components in biofilm formation in "conditioning films". **Conclusions**: These findings suggest that biofilm formation may be associated with the expression of different adhesins. *C. pseudodiphtheriticum* may form biofilm *in vivo* possibly by an adherent biofilm mode of growth *in vitro* currently demonstrated on hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces. The affinity to Fbg and Fn and the biofilm-forming ability may contribute to the establishment and dissemination of infection caused by *C. pseudodiphtheriticum*.

Background

Corynebacterium pseudodiphtheriticum emerged as an opportunistic pathogen responsible for nosocomial infections associated with high mortality of immunocompromised hosts. In various occasions patients suffering from *C. pseudodiphtheriticum* infections had undergone transplants or underlying medical conditions such as chronic obstructive pulmonary disease, malignancies and AIDS. The pathogen is frequently resistant to several antimicrobial agents and may also cause disease in immunocompetent individuals [1,2,3,4,5]. Infections caused by *C. pseudodiphtheriticum* include exudative pharyngitis [6], necrotising tracheitis [7], tracheobronchitis [8], pneumonia [9], bacteremia [10] and endocarditis [11]. *C. pseudodiphtheriticum* have been also associated to catheter-related intravenous infections, including neonates [12,13]. Accordingly, *C. pseudodiphtheriticum* may be more virulent than expected.

Pathogenic microorganisms may have an array of mechanisms that facilitate their attachment to abiotic and biotic surfaces and ability to gain access to adjacent tissues and circulatory system [14,15,16]. A better understanding of the biology and recognition of the virulent potential of *C. pseudodiphtheriticum* strains will certainly help to effectively prevent the infections caused by them. Therefore, the present study was undertaken to demonstrate adhesive activities to abiotic surfaces and biofilm formation by *C. pseudodiphtheriticum* clinical isolates.

Results

Biofilm formation on hydrophilic material. Bacterial viability and morphological features of biofilm produced on glass surfaces demonstrated by CSLM assays are displayed in **Figure 1**. Both ATCC 10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains were able to adhere to

and to produce biofilm on hydrophilic glass surfaces. The photomicrographs showed 2-day-old biofilms in a mature stage exhibiting voids within microcolonies. Microorganisms with intact cell membranes (alive) stained fluorescent green and bacteria with damaged membranes (dead) stained fluorescent red in biofilm communities of *C. pseudodiphtheriticum*.

Biofilm formation on hydrophobic plastic surfaces.

In vitro catheter infection. Evaluation by both Maki's semiquantitave roll plate test (>15 CFU) and quantitative catheter culture assays (> 5.0 x 10^4 CFU) showed that viable bacterial cells of both *C. pseudodiphtheriticum* strains extensively attached to and multiplied on the surfaces of positively charged polyurethane catheter segments as illustrated in **Figure 2A**.

Morphological features of C. *pseudodiphtheriticum* adherence to polyurethane catheters surfaces observed by SEM. Micrographs displayed in **Figure 2** showed lumen (**Figure 2B**) and external (**Figure 2C**) surfaces of polyurethane catheters colonized *in vitro* by the HHC1507/Bacteremia strain. *C. diphtheriae* strain BR-CAT5003748 strain and *S. epidermidis* used as positive controls are displayed in **Figures 2E** and **2F,** respectively. A large amount of biofilm exhibiting bacterial microcolonies and amorphous material was observed on catheter inner surfaces infected with both *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains.

Biofilm formation on polystyrene surfaces. *C. pseudodiphtheriticum* produced biofilm on negatively charged polystyrene surfaces at different levels. The HHC1507/Bacteremia strain and ATCC 10700/Pharyngitis strain were classified into the categories of strongly (+++: 4x $OD_c \leq OD$) and moderately (++: 2x $OD_c < OD \leq$ 4x OD_c) adherent, respectively.

Accordingly, the HHC1507/Bacteremia strain was more hydrophobic than the ATCC 10700/Pharyngitis strain ($p<0.05$) (**Table 1**).

Fbg and Fn binding activities and influence on biofilm formation. Results obtained by the ELISA demonstrated Fbg (30µg/mL) and Fn (30µg/mL) binding activities to both *C. pseudodiphtheriticum* strains (**Table 2**). Fbg and Fn bound with greater affinity to the ATCC10700/Pharyngitis strain when compared with the HHC1507/Bacteremia strain ($p<0.0001$).

C. pseudodiphtheriticum produced biofilm not only on uncoated polystyrene surfaces but also on polystyrene surfaces coated with Fbg and Fn at lower concentrations (50 µg/mL) than that found in the human plasma (2.5 mg/mL) (**Table 1**). Both strains produced biofilm on Fbg or Fn-coated surfaces at similar intensity levels ($p>0.05$). Analysis of the results performed by the methods described by Stepanovic (2000) showed the ATCC10700/Pharyngitis strain classified into the category of strongly (+++: $4x\ OD_c \leq OD$) biofilm producer on Fbg-coated surfaces and into the category of moderately (++: $2x\ OD_c < OD \leq 4x\ OD_c$) biofilm producer on uncoated and Fn-coated polystyrene surfaces. The HHC1507/Bacteremia strain classified into the category of strongly (+++: $4x\ OD_c \leq OD$) biofilm producer on uncoated polystyrene surfaces was classified into the category of moderately (++: $2x\ OD_c < OD \leq 4x\ OD_c$) biofilm producer on both Fbg and Fn-coated polystyrene surfaces.

Discussion

Microbial adhesion and biofilm formation may pose a public health problem. More than 60% of the bacterial infections currently treated by physicians are considered to involve

biofilm formation. Even in individuals with excellent cellular and humoral immune reactions, biofilm infections are rarely resolved by the host defense mechanisms. Taking into account the aging population and the increasing number of implantable medical devices available, it is expected that the number of infections associated with biofilms [18,19] caused by opportunistic pathogens will increase. Biofilm infections develop preferentially on inert surfaces (commonly on medical devices), but they can also form on living tissues, as in the case of invasive infections. Successful treatment in these cases depends on longterm, high-dose antibiotic therapies and the removal of any foreign-body material [15,19,20,21,22].

Some corynebacteria species were found to adhere to available biotic and abiotic surfaces and/or to form biofilms, including *Corynebacterium jeikeium, Corynebacterium macginleyi* and *C. diphtheriae* [23,24,25]. Previous investigations also demonstrated the ability of *C. pseudodiphtheriticum* to adhere to, survive and/or multiply within epithelial cells and also suggested differences in the virulence mechanisms of the clinical isolates, including ATCC10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains [26]. Microorganisms were also capable to survive and multiply in the extracellular environment at least for 24 h post-infection. Different from the ATCC10700/Pharyngitis strain, the HHC1507/Bacteremia strain did not persist in the intracellular compartment and viable bacteria were observed in the supernatants of infected monolayers. Interestingly, the ATCC10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains exhibited an aggregative adherence (AA) pattern that was previously associated with invasiveness and intracellular survival of some human pathogens, including *C. diphtheriae* [27] and *Escherichia coli* (EAEC) [28].

It is generally recognized that the pathogenesis of EAEC can be divided into different stages including adherence, colonization and biofilm formation. EAEC adherence is shown to rely on multiple different factors that altogether contribute in various ways to display the AA

phenotype. It is suggested a correlation between the ability to express AA fimbriae (AAF) and the capability to form biofilm [29,30,31]. Yanagawa & Honda (1976) showed that the ATCC10700 strain possessed a large number of pili, ranging from dozens to more than a hundred, in 91-100% of the bacterial cells.

To the best of our knowledge, this is one of the opening studies concerning adhesion to abiotic surfaces and biofilm formation by *C. pseudodiphtheriticum.* Currently, both AA-like ATCC10700/Pharyngitis and HC1507/Bacteremia *C. pseudodiphtheriticum* strains showed the ability to adhere to available abiotic and/or biotic surfaces and to form biofilms. Data indicated a correlation between the AA phenotype and biofilm formation by *C. pseudodiphtheriticum* strains. Additional studies remain necessary for determining if pili, among other bacterial surfaces components, are involved in AA adherence to epithelial cell surfaces and/or adherence to abiotic surfaces of *C. pseudodiphtheriticum* strains.

Bacteria often switch from a free-living lifestyle to a surface adapted, multicellular lifestyle known as a biofilm. Bacteria in biofilms become highly differentiated from free-living bacteria and often exhibit a developmental sequence characterized into different stages such as: initial attachment, irreversible attachment, maturation and dispersion. Primary adhesion of planktonic bacterial cells is a crucial step in biofilm formation. This initial, reversible microbial adherence is mostly dependent on bacterial cell surface characteristics and on environmental parameters such as the nature of the material surface, availability of substrates and nutrients [33]. It is mainly due to the physicochemical interactions that bacteria firmly adhere to the biomaterial surface during the adhesion process. These comprise van der Waals forces, Lewis acid-base, and electrostatic forces [34]. The presence of bacterial surface-associated proteins may be associated with cell surface hydrophobicity and initial adhesion [15,19,35,36].

In general, biofilm-producing strains demonstrate an increased adherence to plastic surfaces as compared with non-biofilm-producing strains. *C. diphtheriae* and lipophilic skin corynebacteria hydrophobicity was connected with biofilm formation on solid surfaces [24,37]. Similar to *C. diphtheriae*, *Corynebacterium urealyticum* and a number of other bacterial species [34,38,39], the adherence to polystyrene attributed to hydrophobic interactions between cells and this negatively charged plastic surface was also observed for *C. pseudodiphtheriticum*. However, *C. pseudodiphtheriticum* clinical isolates seemed to exhibit differences in their ability of biofilm production on polystyrene surfaces. This activity was significantly higher for the strain associated with invasive disease (HHC1507/Bacteremia strain).

After the initial adhesion to a foreign body surface, bacteria multiply forming microcolonies and accumulate as multilayered cell clusters, a step that involves intercellular adhesion and the synthesis of extracellular matrix molecules, such as proteins and polysaccharides. Microcolony formation is a coordinated, adaptive response that facilitates continued biofilm development and dispersal. Further growth of the attached microorganisms occurs, leading to the formation of dense bacterial aggregates embedded in the exopolymeric matrix surrounded by a network of water channels, typical of mature biofilms [40,41]. Mature biofilms can then undergo a detachment process releasing planktonic bacteria that can then colonize another region of the substratum to form new microcolonies [42].

In the present investigation, *C. pseudodiphtheriticum* strains were found as effective biofilm producers on glass surfaces. Similarly to the catheter-related *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 strain [43], microcolony formation was verified on both hydrophilic (glass) and hydrophobic (polyurethane) surfaces by *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains. Extracellular polymeric substances (EPS) produced by

microorganisms are a complex mixture of biopolymers primarily consisting of polysaccharides, as well as proteins, nucleic acids, lipids and humic substances. EPS make up the intercellular space of microbial aggregates and form the structure and architecture of the biofilm matrix [44]. *C. diphtheriae* adherence to hydrophilic glass surfaces was attributed to the presence of extracellular matrix molecules, especially polysaccharides with high levels of sialic acid residues [38,43,45].

Cell death inside microcolonies is an important physiological event that plays a role in subsequent differentiation and dispersal of a subpopulation of surviving biofilm cells [41]. Presently, CLSM images showed microcolonies of viable bacteria with intact cell membranes stained fluorescent green and dead bacteria with damaged membranes stained fluorescent red in *C. pseudodiphtheriticum* biofilm accretions. The free diffusion of low-molecular-weight compounds fluorescein showed the spatial arrangement of cells and indicated the presence of porosity and channels throughout *C. pseudodiphtheriticum* biofilm. Data suggested that cell death inside microcolonies may play a role in subsequent differentiation and dispersal of a subpopulation of surviving biofilm cells of *C. pseudodiphtheriticum*. However, the mechanism(s) by which voids were created within microcolonies and by which cells inside disperse in mature biofilms need(s) further investigation.

C. pseudodiphtheriticum produced biofilm on abiotic surfaces, including polyurethane medical devices. Although medical devices may differ widely in design and use characteristics, specific factors determine susceptibility of a device to microbial contamination and biofilm formation such as number and type of organisms to which the device is exposed, composition of the medium in or on the device, device material construction and conditioning films on the device all may influence biofilm formation. Polyurethanes are commonly used in a number of medical applications including catheter and

general purpose tubing, hospital bedding, surgical drapes, wound dressings, as well as in a variety of injection molded devices [20,46].

The general findings from the literature indicate that the increased synthesis of exopolysaccharide is often related to biofilm-producing bacteria associated with symptomatic catheter infections [47]. A large amount of biofilm material exhibiting bacterial microcolonies and amorphous material was observed on polyurethane catheter inner surface infected in vitro with *C. pseudodiphtheriticum* and the positive controls (*C. diphtheriae* and *S. epidermidis* strains). Like other Gram-positive pathogens, the gentle nature of the surface irregularities probably did not fully account for trapping *C. pseudodiphtheriticum* on polyurethane catheter surfaces. In accordance with previous observations with *C. diphtheriae* [38,43] the adherence of *C. pseudodiphtheriticum* to polyurethane may be partially explained by the positive electric charges associated with this polymer. The amorphous deposited substances or glycocalyx noted surrounding *C. pseudodiphtheriticum* microcolonies on the surfaces of polyurethane catheters reinforce the fact that the bacteria may produce or attract exopolymeric components that strengthen their attachment to inert surfaces in vitro.

Biofilm material was also observed on polyurethane catheter external surface infected in vitro with *C. pseudodiphtheriticum*. Data suggested that *C. pseudodiphtheriticum,* like other pathogens from exogenous sources (such as the hands of personnel) or microflora endogenous to patients, may invade via the catheter insertion wound and migrate along the external catheter surface eventually colonizing the catheter segment [14].

In natural environments, bacteria mostly adhere to the layer of adsorbed molecules that coats the inert surfaces, the so called "conditioning film", and not directly to the substratum. In vivo, any material surface is rapidly covered by plasma and matrix proteins toward which bacteria may display specific adhesins [48,49]. The stimulation of bacterial

biofilm formation by exogenous mammalian proteins has been reported for many human pathogens [50,51].

Fibronectin (Fn) is a complex glycoprotein found in a soluble form in many body fluids (blood, saliva) and in an insoluble form as a component of cell surfaces, basement membranes, and the extracellular matrices. Soluble plasma Fn interacts with various bacteria and cell surface Fn may serve as a receptor in the adherence of bacteria to host epithelial cells. The ability of various bacteria to interact with different domains on the Fn molecule may play an important role in bacterial adherence and tissue tropism [52]. At least 10 different proteins from *E. coli* bind to Fn leading to internalization of *E. coli* by human host cells including epithelial cells [53]. For *S. aureus*, Fn is targeted by bacteria through Fn-binding proteins (FnBPs), which are anchored to the bacterial cell wall, and these interactions are likely to play a role in the infection process in particular. FnBPs have been shown to mediate not only bacterial adhesion to host cells but also the uptake of bacteria by the cells and biofilm formation [54]. FnBP-promoted biofilm occurred at the level of intercellular accumulation and not primary attachment to Fn or Fbg [56].

Many bacterial pathogens exploit mechanisms involved in coagulation systems to colonize exposed tissue matrix proteins or evade immune mechanisms of bacterial clearance. Fibrinogen (Fbg) is a major protein in human plasma and is primarily involved in the coagulation cascade system through its conversion to insoluble fibrin. Fbg synthesis is dramatically upregulated during inflammation or under exposure to stresses such as systemic infections. Both Fbg and fibrin play overlapping roles in blood clotting, fibrinolysis, inflammatory response, cellular and matrix interactions and wound healing [55,57,58]. A comparative proteome analysis of *S. aureus* biofilm and planktonic cells showed that biofilm cells expressed higher levels of protein associated with cell attachment and, in particular, Fbg-

binding proteins [59]. For *Streptococcus suis,* Fbg binding property allowed bacteria to attach to each other through Fbg-mediated cross-bridging [51] and contributed to the production of biofilm. Fbg binding to *Streptococcus agalactiae* played a significant role in preventing opsonophagocytosis [60].

Like *C. diphtheriae* [43,61,62], the ability of *C. pseudodiphtheriticum* strains to bind to Fn and Fbg was demonstrated in the present study. Interestingly, Fn and Fbg bound with lower affinity to the blood isolate (HHC1507/Bacteremia strain). Fn and Fbg binding properties, possibly favored the adherence to respiratory epithelial surface by the ATCC 10700/Pharyngitis strain. Data suggest that interaction with Fn and Fbg may exhibit a multifactorial nature and relevance in promoting *C. pseudodiphtheriticum* attachment to host epithelial cells, damaged tissues and/or blood clots, as previously observed for other Gram-positive pathogens [51,56].

In addition to the ability of biofilm production directly to hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces, *C. pseudodiphtheriticum* biofilm production was also observed to Fbg and Fn "conditioning films". Nevertheless, the clinical isolates responded inversely in the presence of Fbg and/or Fn bound to the solid surface. When compared to biofilm formation on uncoated polystyrene surfaces, Fbg and/or Fn coated surfaces enhanced biofilm formation by the ATCC10700/Pharyngitis strain and reduced biofilm formation by the HHC1507/bacteremia strain. Therefore, the expression of Fbg and Fn binding adhesins at different levels may be implicated in biofilm formation on "conditioning films" by *C. pseudodiphtheriticum* strains, as previously reported for *S. suis* [51].

Conclusions

Our results suggest that *C. pseudodiphtheriticum* may form biofilm *in vivo* possibly by an adherent biofilm mode of growth *in vitro* demonstrated on hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces, including polyurethane catheters. The affinity to human Fbg and Fn and the biofilm-forming ability appears to be a potential virulence trait that may contribute to the establishment and dissemination of infection caused by *C. pseudodiphtheriticum*, including in patients making use of indwelling medical devices. Further studies remain necessary in order to investigate the involvement of EPS in biofilm formation by *C. pseudodiphtheriticum.*

Material and Methods

Origin of bacterial strains, phenotypic characterization and culture conditions. Two *C. pseudodiphtheriticum* strains, partially studied for their virulence properties and presenting an aggregative-like adherence pattern (AA-like) to human epithelial (HEp-2) cell line – [26] were used in this investigation: ATCC 10700 strain isolated from the upper respiratory tract of a patient with exudative pharyngitis (USA) [6] and HHC1507 strain isolated from blood of a patient with bacteremia (Brazil) [13].

Phenotypic characterization of microorganisms was previously carried out by the semi-automated API-Coryne System 3.0 version (bioMérieux, Lyon, France) according to manufacturers instructions. Both strains produced the numerical pattern 3001004, which was identified by the API Coryne database as *C. pseudodiphtheriticum* with 96.7% probability (T=0.97) with the API web decoding system [4,26,63,64].

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; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) [65].

Biofilm formation to glass surfaces. Morphological features of biofilms produced on glass coverslips by *C. pseudodiphtheriticum* strains were investigated by confocal scanning laser microscopy (CSLM) [66]. Microorganisms were classified as adherent when creating confluent layers of bacterial cells on glass surfaces [38]. The LIVE/DEAD staining kit (Invitrogen, France) using fluorescent markers targeting cell membrane integrity was used to assess membrane integrity of microorganisms and confocal imaging was performed using a Zeiss – Meta LSM 510. The LIVE/DEAD mixture was prepared by mixing components A + B in the kit, consisting of SYTO®9 and propidium iodide, at a ratio of 1:100 with the inoculum medium (TH). Briefly, 1 mL bacterial suspensions was applied to glass coverslips placed in 24-well polystyrene cell culture plates (Nunc, Wiesbaden, Germany). After incubation at 37°C for 48 h, the content of each well was aspirated and washing with phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M; pH 7.2). Biofilms were stained with 2µL SYTO® 9 and 2uL propidium iodide in 3mL PBS. Biofilms were incubated at room temperature for 10 min and washed 2X with PBS. The fluorescence from stained cells was viewed by CSLM. The LIVE/DEAD biofilm viability kit provides a two-color fluorescence assay of bacterial viability growing in biofilm communities, based on membrane integrity. When used alone, the SYTO®9 green fluorescent nucleic acid stain generally labels all bacteria in a population - those with intact membranes and those with damaged membranes. In contrast, propidium iodide red-fluorescent nucleic acid stain penetrates only bacteria with damaged membranes, causing a reduction in the SYTO®9 stain fluorescence when both dyes are present

***In vitro* model of catheter infection.** Polyurethane 16-gauge percutaneous nephrostomy catheters (Intracath; Deseret Pharmaceutical Co., Sandy, Utah) 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 CFU bacteria/mL suspended in TSB medium [14,43]. After 24 h the catheter segments were removed, gently rinsed in PBS (0.01 M; pH 7.2) to eliminate loosely attached planktonic cells.

Quantitative catheter culture and semiquantitative roll plate technique. Catheter infection by *C. pseudodiphtheriticum* strains was evaluated by a quantitative [67] and a semiquantitative roll plate method [68] using Columbia agar base (CAB; Oxoid, Germany) plates supplemented with 5% sheep blood at 37°C for 24 h.

Scanning electron microscopy (SEM). Sections of polyurethane catheters infected with *C. pseudodiphtheriticum* 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. Infected catheter segments with *Corynebacterium diphtheriae* BR-CAT5003748 [43] and *Staphylococcus epidermidis* strains were used as positive controls [14].

Conjugation of Fibrinogen and Fibronectin to Biotin. Experiments were performed as previously described [62,69]. Human plasmatic proteins (purchased from Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) were conjugated to N-hydroxysuccinimidobiotin in dimethyl sulfoxide biotin. Proteins were dissolved in 0.1 M NaHCO3 (pH 9.0) to a total protein concentration of 1.0 mg/mL and added of 20 µL of N-hydroxysuccinimidobiotin in dimethyl

sulfoxide. The mixture was incubated at 20°C for 4 h, and the reaction was mixture by dialyzed against PBS (phosphate buffered saline 0.01M pH 7.2) added 0.02% sodium azide at 4°C overnight.

Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) for determining bacterial interaction with fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) Briefly, microorganisms were previously washed three times with PBS and resuspended in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6 at a concentration of approximately 10^8 CFU/mL [0.2 optical density (OD) at λ=660 nm in a B295II spectrophotometer (Micronal)]. Each well of flat-bottomed microtitre plates (Nunc-Immuno MaxiSorb) were coated with 100 µL bacterial suspensions at 37°C for 1 h and at 4°C overnight. The wells were treated with PBS with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA), for 1h, and 0.05% (w/v) Tween-20 (PBST-BSA) washed three times with PBST. Aliquots of Fbg and Fn solution in PBST-BSA (30µg/mL) were added to each well and the microplates were incubated at 37°C for 1 h. Any unbound protein was removed by washing the wells with PBST. Bacterial interaction with Fbg and Fn were revealed with streptavidin-alkaline phosphatase. The intensity of Fbg and Fn-binding by *C. pseudodiphtheriticum* strains was expressed in OD at 405 nm values (Bio-Rad Model 550 spectrophotometer) and compared statistically by the Tukey test using GraphPad Prism. Differences were considered significant at $p<0.05$.

Biofilm formation on polystyrene surfaces. Biofilm formation on negatively charged polystyrene surface was determined quantitatively in 96-well flat-bottomed microtiter plates according to methods previously described [17,43]. Aliquots of 200 µL of bacterial suspensions (0.2 OD at λ=570 nm) were applied to microplate wells. After incubation at 37°C

for 24 h the content of each well was aspirated and washed three times with 200 μL of PBS (0.01M, pH 7.2). The remaining attached bacteria were fixed with 200 μL of 99% methanol and stained with 2% crystal violet. Negative controls contained TSB only. The bound dye was then solubilized with 160 μL of 33% glacial acetic acid and the OD of the solution was measured at λ=570 nm by using an enzyme immunosorbent assay reader (BioRad, model 550). The cut-off OD (ODc) was defined as the mean OD of the negative control. All strains were classified into the following categories: non-adherent (0: $OD \leq OD_c$), weakly (+: $OD_c < OD \leq 2x\ OD_c$), moderately (++: $2x\ OD_c < OD \leq 4x\ OD_c$) or strongly (+++: $4x\ OD_c \leq OD$) adherent, based upon the ODs of bacterial films.

Influence of Fbg and Fn on biofilm formation. Biofilm formation was determined in 96-well flat-bottomed polystyrene microtiter plates as described above but with some modifications. In these experiments, the wells of microplates were pre-treated with Fbg and Fn at a concentration of 50 μg/mL overnight at 4°C. Fbg and Fn coated wells containing 200 μL of TSB medium without bacteria were used as negative controls [43,70].

Competing interest

No competing financial interests exist.

Authors' contributions

*MCS, JNR and LSS contributed equally to the designing, performing the experiments, interpreting their results and drafting the manuscript. LPS, PSS, CSS, PENF, VVV, DLRG, Jr RH and ALMG participated in experiments and data interpretation. ALMG was also involved

in the designing, critically revison the manuscript for intellectual content and approved the manuscript for publication. All authores read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grant from CAPES, CNPq, FAPERJ, SR-2/UERJ, PNPD (CNPq/ CAPES), PAPD (FAPERJ/CAPES) and PRONEX of the Brazilian Ministry of Science and Technology. We are also grateful to Noêmia Rodrigues Gonçalves Alves from Cellular Ultrastructure Laboratory Hertha Meyer-Universidade Federal do Rio de Janeiro, for electron microscopy technical assistance,.

References

1. Nathan AW, Turner DR, Aubrey C, Cameron JS, Williams DG, Ogg CS, Bewick M. ***Corynebacterium hofmannii* infection after renal transplantation**. *Clin Nephrol*. 1982,**17**: 315-318.

2. von Graevenitz A, Punter-Streit V, Riegel P, Funke G. **Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals**. *J Clin Microbiol* 1998,**36**:2087-2088.

3. Ahmed K, Kawakami, Watanabe K, Mitsushima H, Nagatake T, Matsumoto K. ***Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen**. *Clin Infect Dis* 1995, **20**:41-46.

4. Martins C, Faria L, Souza M, Camello T, Velasco E, Hirata RJr, Thuler L, Mattos-Guaraldi A. **Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009,**104**:905-913.

5. Olender A, Niemcewicz M. **Macrolide, lincosamide, and streptogramin B-constitutive-type resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from upper respiratory tract specimens**. *Microb Drug Resist* 2010,**16**:119-122.

6. 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,**73**:65-68.

7. Colt HG, Morris JF, Marston BJ, Sewell DL. **Necrotizing tracheitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: unique case and review**. *Rev Infect Dis* 199,**113**: 73-76.

8. Craig TJ, Maguire FE, Wallace MR. **Tracheobronchitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum***. *South Med J* 1991,**84**:504-506.

9. Morinaga Y, Yanagihara K, Yamada K, Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Inoue Y, Kamihira S, Kohno S. **[Two cases of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* respiratory tract infection]**. *Kansenshogaku Zasshi* 2010,**84**: 65-68.

10. Das BB, Schnell P, Mendez H 2003. ***Corynebacterium pseudodiphtheriticum* bacteremia in an immunocompetent adolescent: a case report an review of literature**. *Eastern J Med* **8**:18-19.

11. Morris A, Guild I. **Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains**. *Rev Infect Dis* 1991, **13**:887-892.

12. Camello, TCF, Mattos-Guaraldi, AL, Formiga, LCD, Marques, EA. **Nondiphtherial Corynebacterium species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil**. *Braz J Microbiol* 2003,**34**:39-44.

13. Camello TCF, Souza MC, Martins CA, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. ***Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries**. *Lett Appl Microbiol* 2009,**48**:458-464.

14. Franson TR, Shet NK, Rose HD, Sohnle PG. **Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters**. *J Clin Microbiol* 1984,**20**:500-505.

15. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. *Science* 1999,**284**:1318-1322.

16. Smani Y, McConnell MJ, Pachón J. **Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells**. *PloS One* 2012,7:33073.

17. Stepanovic S, Vukovic D, Davic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation**. *J Microbiol Methods* 2000,**40**:175–179.

18. Stewart PS, Costerton JW. **Antibiotic resistance of bacteria in biofilms**. *Lancet* 2001, **358**:135-138.

19. Sousa C, Botelho C, Oliveira R: *Nanotechnology applied to medical biofilms control. In Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*: A. Méndez-Vilas; 2011.

20. Donlan RM, Costerton JW. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms**. *Clin Microbiol Rev* 2002,**15**:167-193.

21. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. **Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis***. *Infect Immun* 2004,**72**:3658-3663.

22. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. **Survival strategies of infectious biofilms**. *Trends Microbiol* 2005,**13**:34-40.

23. Wang CC, Mattson D, Wald A. ***Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters**. *Bone Marrow Transplant* 2001, **27**:445–449.

24. Kwaszewska AK, Brewczyńska A, Szewczyk EM. **Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria**. *Pol J Microbiol* 2006,**55**:189-193.

25. Suzuki T, Iihara H, Uno T, Hara Y, Ohkusu K, Hata H, Shudo M, Ohashi Y. **Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi***. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:3833-3836.

26. Souza MC, Santos LS, Gomes DL, Sabbadini OS, Santos CS, Camello TC, Asad LM, Rosa AC, Nagao PE, Hirata Júnior R, Mattos-Guaraldi AL. **Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012,**107**:486-493.

27. Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DL, Damasco PV, Rosa AC, Nagao PE, Pimenta FP, Mattos-Guaraldi AL. **Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis**. *Braz J Med Biol Res* 2008,**41**:986-991.

28. Pereira ACM, Britto-Filho JD, Carvalho JJ, Luna MG, Rosa ACP. ***Escherichia coli* enteroaggregative (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells**. *Microb Pathog* 2008,**45**:310-314.

29. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. **Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection**. *FEMS Microbiol Lett* 2006,**254**:12-18.

30. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. **A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli***. *J Med Microbiol* 2006,**55**:1303-1311.

31. Fujiyama R, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Manago K, Kawano Y. **The shf gene of a Shigella flexneri homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation**. *Curr Microbiol* 2008,**56**:474-480.

32. Yanagawa R, Honda E. **Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium***. *Infect Immun* 1976,**13**:1293-1295.

33. Stanley NR, Lazazzera BA. **Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation**. *Mol Microbiol* 2004,**52**:917-924.

34. Rosenberg M. **Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity**. *Appl Environm Microbiol* 1981,**42**:375-377.

35. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. **Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci**. *Lancet Infec Dis* 2002,**2**:677-685.

36. Oliveira R, Azeredo J, Teixeira P: *The importance of physicochemical properties in biofilm formation and activity. In: Wuertz S, Bishop PL, Wilderer PA, eds. Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach, London*: IWA Publishing; 2003.

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

38. 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.

39. Soriano F, Huelves L, Naves P, Rodriguez-Cerrato V, Del Prado G, Ruiz V, Ponte C. **In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum***. *J Antimicrob Chemother* 2008,**63**:353–356.

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

41. Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M, Kjelleberg S. **Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development**. *J Bacteriol* 2003,**185**:4585–4592.

42. Karatan E, Watnick P. **Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms**. *Microbiol Molec Biol Rev* 2009,**73**:310-347.

43. Gomes DL, Martins CA, Faria LM, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, Souza MC, Alves GB, Rosa AC, Nagao PE, Pereira GA, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi 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.

44. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. **Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation**. *Molecules* 2009,**14**:2535-2554.

45. Moreira LO, Andrade AF, Vale MD, Souza SM, Hirata RJr, 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**:5907-5913.

46. Donlan RM. **Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? Curr Top Microbiol Immunol** 2008,**322**:133-161.

47. 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.

48. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. **Mechanisms of adhesion by oral bacteria**. *Ann Rev Microbiol* 1996,**50**:513-552.

49. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. **Prevalence of cna, fnbA and fnbB adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant**. *FEMS Microbiol Lett* 2005,**246**:81-86.

50. Akiyama H, Ueda M, Kanzaki H, Tada J, Arata J. **Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin**. *J Dermatol Sci* 1997,**16**:2-10.

51. Bonifait L, Grignon L, Grenier D. **Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance**. *Appl Environm Microbiol* 2008,**74**:4969-4972.

52. Hynes RO: *In Fibronectins*: Springer±Verlag; 1990.

53. Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA. **Fibronectin: a multidomain host adhesion targeted by bacterial fibronectin-binding proteins**. *FEMS Microbiol Rev* 2011,**35**:147-200.

54. Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford A R., Gurusiddappa S, Kim JH, Pilka ES, Briggs JAG, Gough TS, HoÈoÈk M, Campbell ID, Potts JR. **Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem β-zipper** *Nature* 2003,**423**:177-180.

55. Davis SL, Gurusiddappa S, McCrea KW, Perkins S, Höök M. **SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the Bbeta chain**. *J Biol Chem* 2001,**276**:27799-27805.

56. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP. **A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB**. *J Bacteriol* 2008,**190**:3835-8350.

57. Cheung AL, Krishnan M, Jaffe EA, Fischetti VA. **Fibrinogen acts as a bridging molecule in the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells**. *J Clin Invest* 1991,**87**:2236-2245.

58. Mosesson MW. **Fibrinogen and fibrin structure and functions**. *J Thromb Haemost*. 2005,**3**:1894-1904.

59. Resch A, Leicht S, Saric M, Pasztor L, Jakob A, Gotz F, Nordheim A. **Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling**. *Proteomics* 2006,**6**:1867-1877.

60. Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schroten H. **Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae***. *Infect Immun* 2005, **73**:4404-4409.

61. Souza SMS, Nagao PE, Bernardo-Filho M, Pereira GA, Napoleão F, Andrade AFB, Hirata JrR, Mattos-Guaraldi AL.**Technetium-99m labeling and fibronectin binding ability of *Corynebacterium diphtheriae*.** *Braz J Bio. Eng* 2004,**20**:35-40.

62. Sabbadini PS, Genovez MR, Silva CF, Adelino TL, Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Dias AA, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. **Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010,**105**:706-711.

63. **The API web decoding system**[https://apiweb.biomerieux.com/]

64. Almuzara MN, De Mier C, Rodríguez CR, Famiglietti AM, Vay CA. **Evaluation of API Coryne System, version 2.0, for diphtheroid Gram-positive rods identification with clinical relevance**. *Rev Argent Microbiol* 2006,**38**:197-201.

65. Hirata R, Napoleão F, Monteiro-Leal LH, Andrade AF, Nagao PE, Formiga LC, Fonseca LS, Mattos-Guaraldi AL. **Intracellular viability of toxigenic**

***Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells**. *FEMS Microbiol Lett* 2002,**215**:115-119.

66. Chávez de Paz LE, Resin A, Howard KA, Sutherland DS, Wejse PL. **Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms**. *Appl Environm Microbiol* 2011,**77**:3892-3895.

67. Dooley DP, Garcia A, Kelly JW, Longfield RN, Harrison L. **Validation of catheter semiquantitative culture technique for non staphylococcal organisms**. *J Clin Microbiol* 1996,**34**:409-412.

68. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. **A semi quantitative culture method for identifying intravenous catheter-related infection**. *N Engl J Med* 1977,**296**:1305-1309.

69. Harlow EE, Lane DP: *Antibodies: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.

70. Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. **Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci**. *Appl Environm Microbiol* 2006,**72**:2864-2875.

Tables and Figures legends

Table 1. Biofilm formation on polystyrene surfaces in absence and presence of fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains

Table 2. Fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) binding to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains evaluated by ELISA

Figure 1. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) assays for examination of bacterial viability and biofilm's structural architecture on glass surfaces of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (**A, B, C**) ATCC10700/Pharyngitis strain and (**D, E, F**) HHC1507/Bacteremia strain. Biofilms in a mature stage (2-day-old) exhibited voids within microcolonies. Microorganisms with intact cell membranes (alive) stained fluorescent green and bacteria with damaged membranes (dead) stained fluorescent red in biofilm communities. Magnification X 40 (A, B, D, E).

Figure 2. Biofilm production *in vitro* on polyurethane catheter by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. (A) The Maki's roll plate method indicated bacterial confluent growth on the surfaces of polyurethane catheter. Scanning electron micrographs showed: (**B**) Bacterial microcolonies and amorphous material on the catheter inner surface; (**C**) Biofilm formation on the external surface of the catheter; (**D**) Surface of an unused sterile polyurethane catheter characterized by multiple gentle linear irregularities; (**E**) Biofilm formation by *Corynebacterium diphtheriae* BR-CAT5003748 strain and (**F**) *Staphylococcus epidermidis* strains (positive controls).

Table 1. Biofilm formation on polystyrene surfaces in absence and presence of fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains

C. pseudodiphtheriticum strains	Polystyrene binding (OD ± SD)								
	Control w/o bacteria	Test w/bacteria	Category	Control Fbg w/o bacteria	Test Fbg w/ bacteria	Category	Control Fn w/o bacteria	Test Fn w/ bacteria	Category
ATCC10700/Pharyngitis	0.095±0.008	0.239±0.084[a]	++	0.168±0.066	0.686±0.146[b]	+++	0.146±0.009	0.367±0.036[c]	++
HHC1507/Bacteremia	0.095±0.008	0.730±0.071[a]	+++	0.168±0.066	0.432±0.116[b]	++	0.146±0.009	0.333±0.021[c]	++
		$p<0.05$*			$p>0.05$*			$p>0.05$*	

W, with; w/o, without; OD±SD, Optical Density at λ= 570 nm ± Standard Deviation; The cut-off OD (ODc) was defined as the mean OD of the negative control. Microorganisms were classified into the categories: non-adherent (0: $OD \leq OD_c$), weakly (+: $OD_c < OD \leq 2x\ OD_c$), moderately (++: $2x\ OD_c < OD \leq 4x\ OD_c$), or strongly (+++: $4x\ OD_c \leq OD$) adherent, based upon the ODs of bacterial films (Stepanovic et al., 2000; Gomes et al., 2009). Data were from three independent experiments and compared statistically by the Tukey test using GraphPad Prism 6.0. Differences were considered significant at $p<0.05$.

Table 2. Fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) binding to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains evaluated by ELISA

C. pseudodiphtheriticum strains	ELISA (OD ± SD)	
	Fbg (30µg/mL)	Fn (30µg/mL)
ATCC10700/ Pharyngitis	0.345 ± 0.2040	0.414 ± 0.3838
HHC1507/Bacteremia	0.302 ± 0.0553	0.248 ± 0.0297
	$p<0.0001$	$p<0.0001$

OD±SD, Optical Density ± Standard Deviation; The intensity of human Fbg (30µg/mL) and human Fn (30µg/mL) binding by *C. pseudodiphtheriticum* strains was expressed in OD values at λ=450 nm (Bio-Rad Model 550 spectrophotometer). Data were from three independent experiments and compared statistically by the Tukey test using GraphPad Prism 6.0. Differences were considered significant at $p<0.05$.

Artigo 4: Internalization of *C. pseudodiphtheriticum* by epitelial cells induces apoptosis .

Autores **Souza MC**, Santos LS, Costa AFE, Santos GJ, Conceição SL, Rosa ACP, Nagao PE , Hirata Jr R, Santos CS, Mattos-Guaraldi AL.

Revista: (**Em fase final de redação)**

Resumo

A eficiência para matar células não fagocíticas pode ser vantajoso para a sobrevivência de micro-organismos patogénicos no hospedeiro e um importante passo inicial da infecção. O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de amostras de *Corynebacterium pseudodiphthriticum* isoladas de pacientes com infecções localizada (ATCC10700/Faringite) e sistêmica (HHC1507/Bacteremia) de matar as células epiteliais, um microrganismo comensal de pele e trato respiratório superior, que pode ser implicado como causa de infecções respiratórias e não respiratória humanas. Estudos anteriores mostraram que as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* foram capazes de sobreviver dentro de células HEp-2 por 24 h pós-infecção. A persistência intracelular e o crescimento bacteriano no meio extracelular após 24h de incubação foi observada. O método de coloração azul Trypan indicou um aumento significativo no número de células mortas 24 h pós-infecção com *C. pseudodiphtheriticum*. Alterações nucleares e de morte da célula hospedeira foram evidenciadas pelo ensaio de coloração de azul de Trypan, microscopia electrônica de transmissão e DAPI. As alterações morfológicas em células HEp-2 foram observadas 24 h pós-infecção, incluindo a vacuolização, a fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos. Adicionalmente, foi observada uma diminuição significativa no tamanho das células infectadas com amostras de *C. pseudodiphtheriticum* revelada pelo método de citometria de fluxo. Além disso, o método de dupla coloração com iodeto de propídio / anexina V permitiu a detecção da ocorrência de necrose e apoptose tardia. Em conclusão, as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* estudadas foram capazes de induzir apoptose e necrose em células epiteliais humanas.

Title Page

Internalization of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* by human epithelial cells induces apoptosis

Monica Cristina Souza[1], Louisy Sanches dos Santos[1], Andreia Ferreira Eduardo da Costa[2], Gabriela Santos Jonathan[2], Simone Lima da Conceição[3], Ana Claúdia de Paula Rosa,[1]Prescilla Emy Nagao Ferreira[2], , Raphael Hirata Júnior[1], Cíntia da Silva Santos[1]Ana Luiza Mattos-Guaraldi[1]*

[1] Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas. Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica - LDCIC, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

[2] Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro,UERJ, Rio de Janeiro, RJ – Brazil;

[3] Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas. Departamento de Patologia e Laboratórios, Universidade do Estado do Rio de Janeiro,UERJ, Rio de Janeiro, RJ – Brazil;

Key words: Corynebacterium pseudodiphtheriticum, invasion, persistance, apoptosis.

Running title: Apoptosis induction by *C. pseudodiphtheriticum*

**Corresponding author*: Dr. Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar. Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ 20.551-030, Brazil. E-mail: guaraldi@uerj.br

Abstract

The efficiency to kill non-phagocytic cells might be advantageous for the survival of pathogenic microorganism on host and an important initial step of infection. The present study aimed to evaluate the ability to isolated from patiets with localized infections (ATCC10700/ pharyngitis) and systemic (HHC1507/bacteremia) of *Corynebacterium pseudodiphthriticum* strains kill epithelial cells, a commensal microorganism on the skin and upper respiratory tract, that may be implicated as a cause of respiratory and nonrespiratory human infetions. Previous experiments showed that *C. pseudodiphtheriticum* strains were able to survive within HEp-2 cells at 24 h post-infection. The intracellular persistence and bacterial growth in the extracellular environment after this long period of incubation (24 h) was observed. Trypan blue staining method indicated a significant increase in the number of dead cells was observed after 24 h incubation with *C. pseudodiphtheriticum*. Host cell death and nuclear alterations were evidenced by the Trypan blue exclusion assay, transmission electron microscopy and DAPI staining fluorescence microscopy. Morphological changes in HEp-2 cells observed 24 h post-infection included vacuolization, nuclear fragmentation and the formation of apoptotic bodies. Addicionally, flow cytometry revealed an significant decrease in cell size of infected HEp-2 cells (24 h) with *C. pseudodiphtheriticum* strains. Furthermore, a double-staining assay using Propidium Iodide/Annexin V gave information about the numbers of vital *vs*. early apoptotic cells and late apoptotic or secondary necrotic cells. In conclusion, *C. pseudodiphtheriticum* strains were able to induce host cell death, as well as, exhibit strategies to exert apoptosis and necrosis in human epithelial cells.

.

Introduction

Corynebacterium pseudodiphtheriticum, a commensal microorganism on the skin and upper respiratory tract, progressively more resistance to antimicrobial agents, has been responsible for severe nosocomial infections and associated with high mortality in compromised hosts (Ahmed *et al*., 1995; Burke *et al*., 1997; von Graevenitz *et al*., 1998; Camello *et al*., 2009; Martins *et al*., 2009; Bittar *et al*., 2010; Olender & Niemcewicz 2010; Souza *et al*., 2012). Despite significant differences in age and functional *status* of patients *C. pseudodiphtheriticum* may be implicated as a cause of respiratory and nonrespiratory human infections (Camello *et al*., 2009; Moyad, 2013). Little is known about the virulence factors and pathogenesis of *C. pseudodiphtheriticum*. Some characteristics that may explain how *C. pseudodiphtheriticum* strains cause infection in human patients were recently verified (Souza *et al*., 2012). Data showed that the affinity to human fibrinogen (Fbg) and fibronectin (Fn) (Souza *et al*., 2013 in submission) and the biofilm-formation ability may contribute to the establishment and dissemination of infection caused by *C. pseudodiphtheriticum*. Moreover, micro-organisms also exhibited an aggregative adherence-like pattern to cultured human epithelial (HEp-2) cells characterized by clumps of bacteria with a "stacked-brick" appearance. Bacterial internalization and cytoskeletal rearrangement partially triggered by the activation of tyrosine kinase activity was also verified. Investigations showed differences in the ability of *C. pseudo-diphtheriticum* strains to enter and survive within epithelial cells, as previously observed for *Corynebacterium diphtheriae* (Souza *et al*., 2012). Although *C. pseudo-diphtheriticum* strains did not demonstrate an ability to replicate intracellularly, HEp-2

cells were unable to fully clear the pathogen within 24 h (Souza *et al*., 2012). As the ability to induce uptake by nonphagocytic cells and to migrate across epithelial cell barriers may be important in the early stages of respiratory and/or systemic infections (Sabbadini *et al*., 2012), we thus sought to determine whether internalization of metabolically active *C. pseudodiphtheriticum* organisms produces cytotoxic effects in infected HEp-2 cells and whether apoptosis contributes to *C. pseudodiphtheriticum*-induced epithelial cell death.

Material and Methods

Bacterial strains and culture conditions - *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700 strain, isolated from exudative pharyngitis (USA) (Izurieta *et al*., 1997), and HHC 1507 *C. pseudodiphtheriticum* strain isolated from the blood sample of a patient with bacteremia (Brazil) (Camello *et al*., 2009) both partially investigated (Souza *et al*., 2012; Camello *et al*., 2009) were used in experiments. Identification of microorganisms carried out by the conventional biochemical tests (Funke & Bernard, 2007; Camello *et al*., 2009) was re-confirmed by the use of the API-Coryne System (bioMérieux, Lyon, France), according to instructions given by the manufacturers; profiles accepted, 1001004, 3001004 (all possibility >90%) (Almuzara *et al*., 2006). Stock cultures were maintained in 10% skim milk containing 25% glycerol at -80ºC. All experiments were conducted with microorganisms grown in Trypticase Soy Broth (TSB) for 48 h at 37ºC and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS;0.01 M; pH 7.2) (Hirata Jr *et al*., 2002).

Intracellular viabillity and persistence - The human epithelial cell line HEp-2 (ATCC CCL23) (HeLa derivative) was grown in Eagle Minimum Essential Medium (MEM -

Sigma) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS e Gibco BRL, NY, USA), 50 mg ml-1 gentamicin, 2.5 mg mL^{-1} amphotericin B, and 0.5% L-glutamine. Cells were incubated at 37ºC in atmosphere of 5% CO_2 and 95% humidity (Hirata Jr *et al*., 2002). HEp-2 cells were grown to about 95% confluence in 24 wells microtiter plates, and infected with *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700/ Exudative Pharyngitis and HHC 1507/Bacteremia strains suspended in MEM to 10^7 CFU mL^{-1}. Quantitative experiments human epithelial (HEp-2) persistence and intracellular survival assays after incubation periods of 24 h were performed as previously described (Moreira *et al*., 2003; Souza *et al*., 2012). The percentage of intracellular bacteria was deduced from the number of HEp-2 cell-associated bacteria. Index values of the IC related to bacteria associated with HEp-2 cell monolayers were also determined (Hirata Jr *et al*., 2002; 2004; Moreira *et al*., 2003). The bacterial counts (CFU) in supernatants and HEp-2 monolayer lysates were determined. The percentage of cell-associated bacteria (EC + IC) at each incubation period was calculated as follows: lysate CFU × (lysate CFU + supernatant CFU)-1 × 100 (Moreira *et al*., 2003). To evaluate bacterial persistence, viable bacteria were recovered from the lysates of monolayers maintained in the presence of gentamicin for 24 h (T24P). Briefly, the monolayers were washed six times with PBS post-infection and subsequently treated with 150 µg mL-1 gentamicin sulphate for 24 h. The persistence of intracellular bacteria was determined by viable counts (CFU mL^{-1}) conducted after the monolayers were lysed with 250 µL of 0.1% Triton X-100 in PBS at 24 h post-infection (Döpfer *et al*., 2001).

Trypan blue exclusion method - Trypan blue exclusion method was used to evaluate cells undergoing plasma membrane disruption. Semi-confluent HEp-2 cells were grown for 24 h on circular glass cover slips (13 mm diameter) in 24-well-tissue culture plates.

The cells infected for 24 h were then washed twice with PBSD and stained with 0.4% Trypan blue solution diluted at a ratio of 10:1 in PBSD. The number of dead (blue stained) cells was observed under bright field microscopy. A minimum of 400 cells were counted for each treatment (Ordway *et al*., 2003; Santos *et al*., 2010). Two independent experiments were carried out in duplicate.

DAPI staining - HEp-2 cells were grown to semi-confluence for 24 h on circular glass cover slips (13 mm diameter) in 24-well-tissue culture plates. After 24 h incubation, the cells monolayers infected by *C. pseudodiphtheriticum* strains were fixed with PBS buffered 4% formaldehyde (Merck) for 30 min at room temperature and washed with PBS. For the examination of nuclear morphology, 1 mg mL^{-1} DAPI (Sigma) was added to the fixed cells and kept for 5 min. DAPI stained cells were observed under a fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at excitation of 350 nm wavelength. Nuclei are considered to have the normal phenotype when glowing bright and homogenously. Apoptotic nuclei were identified by the condensed chromatin gathering at the periphery of the nuclear membrane or a total fragmented morphology of nuclear bodies (Ghosh *et al*., 1998; Santos *et al*., 2010).

Flow cytometric analysis - Evaluation of cell morphological changes HEp-2 cells were collected for the assessment of shape change by measuring forward scatter (FSC) properties on the flow cytometer. Two independent experiments were carried out in duplicate. Assessment of apoptosis by Propidium Iodide (PI)/Annexin V(AV) double staining *e*xposure of phosphatidylserine residues at the surface of HEp-2 cells were assessed through flow cytometric analysis of labeling with AV, using FITC-AV conjugate apoptosis detection kit (Sigma). After 24 h incubation with *C.*

pseudodiphtheriticum strains, the cells were detached by trypsinization and incubated in binding buffer containing 0.6 mg mL^{-1} FITC-AV and 2 mg mL^{-1} PI for 10 min. Fluorescence intensity of PI and FITC-AV was monitored by using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) with excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 525 nm and 625 nm, respectively. For each sample, 10,000 individual cells were analyzed. Viable cells exhibit PI/AV (Vermes *et al*., 2000) and (control cells are represented on the low left hand quadrant in the plot). The necrotic cells lost cell membrane integrity that permits PI entry; PI/AV (upper left quadrant in the plot). Early apoptotic cells with intact plasma membrane integrity exhibit PI/AV (lower right quadrant in the plot). Late apoptotic cells or cells with secondary necrosis (the phase consecutive to apoptosis in vitro) exhibit PI/AV (upper right quadrant in the plot) (Vermes *et al*., 2000). Two independent experiments were carried out in duplicate.

Statistical analysis - Results are expressed as means ± SEM of data obtained in at least three different experiments. Statistical differences between groups were determined with the unpaired Student t test or onewayanalysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's or Tukey's Multiple Comparison Test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Transmission electron microscopy (TEM) - HEp-2 cells infected by *C. pseudodiphtheriticum* strains for 6 h were rinsed and fixed with 0.1 M cacodylated buffer pH 7.2 containing 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.1 M $CaCl_2$ for 1 h at 4ºC. Monolayers were post-fixed with 2% OsO_4, 5 mM $CaCl_2$ and 0.8% K4[Fe(CN6)] in cacodylated buffer for 1 h, 22ºC, and dehydrated through a series of

graded ethanol solutions and embedded in Epon. Ultra-thin sections were examined under a Zeiss EM 906 transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) (Hirata Jr *et al*., 2004).

Results

Persistance and survival withim epithelial cells

Previous experiments showed that *C. pseudodiphtheriticum* ATCC10700 strains were able to survive within HEp-2 cells at 24 h post-infection ($1.07x10^7$ CFU) ($p<0.05$). For the HHC1507/Bacteraemia strain, viable bacterial cells were only observed in the supernatant of infected HEp-2 cells at 24 h post-infection ($9x10^5$ CFU) ($P<0.05$). The intracellular persistence and bacterial growth in the extracellular environment after this long period of incubation (24 h) was observed only for the ATCC 10700/Pharyngitis type strain. The clinical isolates were unable to replicate intracellularly under the experimental conditions that were used (Souza *et al*., 2012).

Hep-2 cells viability. Results concerning Trypan blue staining method used to assess whether the plasma membranes of infected HEp-2 cells had suffered permeability changes are presented in **Figure 1**. A significant increase ($P<0.05$) in the number of dead cells was observed after 24 h incubation with ATCC10700/Pharyngitis (18.00±1.224) and HHC1507/Bacteremia (12.40±2.073) (Figure 1B). Data also indicated detachment of HEp-2 cells 24 h post infection with HHC1507/Bacteremia (data not shown).

Morphological changes in HEp-2 cells. Host cell death and nuclear alterations were evidenced by the Trypan blue exclusion assay (**Figure 1A)**, TEM (**Figure 1D)** and

DAPI fluorescence microscopy (**Figure 1C**). Morphological changes in HEp-2 cells observed 24 h post-infection included vacuolization, nuclear fragmentation and the formation of apoptotic bodies.

Cell size index. Flow cytometry analysis showed a significant decrease in cell size (FSC, forward light scatter) of infected HEp-2 cells (24 h) with *C. pseudodiphtheriticum* strains ($P<0.05$) (**Figure 2A).** The infection of HEp-2 cells with ATCC10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains caused similar reductions in cell volume equivalent to 37.04% and 31.03% post, respectively ($P>0.05$).

Assessment of apoptosis by double staining Propidium Iodide (PI)/Annexin V (AV) assay. Flow cytometric double-staining assay using Propidium Iodide/Annexin V gave information about the numbers of vital *vs*. early apoptotic cells and late apoptotic or secondary necrotic cells. Represented in **Figure 2B** are the results of experiments analyzed by flow cytometry that gave information about the numbers of vital (PI/AV) *vs*. apoptotic (PI/AV) cells, and that concurrently provided the number of late apoptotic or secondary necrotic cells (PI/AV). Compared to the untreated control cells **(Figure 2B)**, significant proportions of early (PI/AV) and late (PI/AV) apoptotic cells appeared only for HEp-2 cells infected with *C. pseudodiphtheriticum* ATCC10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains death corresponding to 82.52% and 83.81%, respectively. HEp-2 cells infected with *C. pseudodiphtheriticum* ATCC10700/Pharyngitis strain exhibited 43.20% (PI/AV) apoptotic and a proportion of 38,73% (PI/AV) seemed o represent late apoptotic cells that were binding AV and taking up PI. The *C. pseudodiphtheriticum* HHC1507/Bacteremia strain exhibited 42.27% (PI/AV) apoptotic and a proportion of 41.25% (PI/AV) seemed o represent late

apoptotic cells that were binding AV and taking up PI. The total % (early and late) of apoptotic cells corresponded to 81.93% and 83.52% for HEp-2 cells infected with *C. pseudodiphtheriticum* ATCC10700/Pharyngitis and *C. pseudodiphtheriticum* HHC1507/Bacteremia strains, respectively.

Discussion

The ultimate goal of all pathogens is to establish a site, or a replicative niche, in the host where the pathogen can multiply. Previous studies show that bacterial pathogens possess unique traits that provide a survival advantage upon infection of the host (Faherty & Maurelli, 2008). Moreover, the behavior of a microorganism within epithelial cells provides some insight into its overall pathogenic strategy. Bacterial internalization by epithelial cells indicates that such species have developed specialized mechanisms that co-opt normal host cell functions and stimulate their own uptake and adaptation to the intracellular environment (Meyer et al., 1997).

Infectious organisms are frequently introduced into the cell by endocytosis. Cytoplasmic vacuolization and degradation suggest the death of infected cells, which could provide a route for the dissemination of microorganisms to distal sites, where foci of metastatic infection could be established (Henics & Wheatley, 1999). Recent studies showed numerous bacteria within single membrane-bound vacuoles and concomitant epithelial cell detachment during the invasion of *C. pseudodiphtheriticum* in HEp-2 cells (Souza et al., 2012). These mechanisms may be relevant for *in vivo* infections, allowing *C. pseudodiphtheriticum* to breach the epithelial cell barrier and enter deeper tissues.

The persistence and intracellular survival of *C. pseudodiphtheriticum* into epithelial cells may also contribute for the maintenance of the pathogens in the human body as it would be protected against host immune control mechanisms and antimicrobial agents used in therapy, as previously observed in studies investigating *Staphylococcus aureus* survival within endothelial cells (Menzies & Kourteva, 1998). Moreover, Souza and co-workers (2012) demonstrated that *C. pseudodiphtheriticum* strains expressed autoaggregative and hydrophobic properties that may help to deceive the immune defense and consequently favor bacterial attachment and survival on cutaneous and/or mucosal surfaces.

Execution of apoptosis is initiated by a proinflammatory program and induced either by immune competent cells or epithelial cells. On the other hand, apoptosis could be a strategy of microbial pathogen to escape from the infected and exhausted host cell to invade deeper mucosal layers for a prolonged bacterial colonization (Martin, 2010). Mucosal epithelial cells can respond to bacteria by several different mechanisms (Zylchinsky & Sansonetti 1997; Herard *et al*., 1996). Unlike other mucosal surfaces, the respiratory epithelium is highly resistant to apoptosis, and this response is activated only when the appropriate epithelial conditions are present, as well as virulent bacterial strains capable of coordinately expressing both adhesins and cytotoxins (Rajan *et al*., 2000). *C. pseudodiphtheriticum* may exhibit mechanisms of cell death similar to those previously observed for non-toxigenic *C. diphtheriae* strains (Santos et al., 2010). Apoptotic body formation,changes in membrane permeability and a significant decrease in HEp-2 cell viability suggested a later phase of apoptosis or secondary necrosis at later phase of infection (24 h). Similar to *Mycobacterium tuberculosis* (Danelishvili *et al*., 2003) and *C. diphtheriae* (Sabbadini *et al*., 2012), *C. pseudodiphtheriticum* induce both apoptosis and necrosis in human epithelial cells. In conclusion, *C.*

pseudodiphtheriticum strains evolved mechanisms to promote their survival and replication as well as strategies to exert apoptosis and necrosis in human epithelial cells, an essential step to reach to deeper tissues or other sites.

Figure legend

Figure 1. Morphological changes in HEp-2 cells observed 24 h post-infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* HHC1507/Bacteremia strain.(**A**) Trypan blue staining assays illustrated the presence of blebs on the surface of HEp-2 cells, cytoplasmic vacuolization, nuclear fragmentation and apoptotic bodies; (**C**) DAPI staining showed aggregation and condensation of DNA. Magnification 100x; (D) Transmission electron microscopy images of infected HEp-2 cells showed condensed chromatin along the nuclear envelope; **(B)** HEp-2 cells viability at 24 h post-infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* assessed by Trypan blue exclusion staining assay. Statistical differences were determinate by ANOVA test. The data were expressed as mean ± SEM of two independent experiments carried out in duplicate. $^{a, b}$, $P<0.05$.

Figure 2 Flow cytometric analysis of phosphatidylserine externalization (Annexin V binding) and cell membrane integrity (PI staining) in HEp-2 cells. (A) Flow cytometry analysis showed effect of interaction of *C. pseudodiphtheriticum* strains on changes in forward scattering properties (shape change) of human HEp-2 epithelial cells (24 h) with *C. pseudodiphtheriticum* ATCC10700/Pharyngitis and HHC1507/Bacteremia strains. Experiments were carried out in duplicate. (B) The dual parametric density plots combining Annexin V-FITC and PI fluorescence show the viable cell population in the lower left quadrant (Annexin V/PI), the early apoptotic cells in the lower right quadrant (Annexin V/PI), and the late apoptotic cells in the upper right quadrant (Annexin V/PI).

Dot plot of forward (FSC) and side (SSC) scatter of unlabeled HEp-2 cells. Gate 2 was designed for the single color assay to include as many eukaryotic cells as possible.

References

Ahmed K, Kawakami, Watanabe K, Mitsushima H, Nagatake T, Matsumoto K. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. Clin Infect Dis. 1995; 20:41-46.

Almuzara MN, De Mier C, Rodríguez CR, Famiglietti AM, Vay CA. Evaluation of API Coryne System, version 2.0, for diphtheroid Gram-positive rods identification with clinical relevance. Rev Argent Microbiol 2006; 38:197-201.

Bittar F, Cassagne C, Bosdure E, Stremler N, Dubus JC, Sarles J, Reynaud-Gaubert M, Raoult D, Rolain JM. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. Emerg Infect Dis. 2010; 16: 1231-1236.

Burke GJ, Malouf MA, Glanville AR. Opportunistic lung infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* after lung and heart transplantation. Med J Aust. 1997; 166: 362-364.

Camello TCF, Souza MC, Martins CA, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. Lett Appl Microbiol. 2009; 48:458-464.

Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ, Bermudez LE. Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. Cell Microbiol. 2003;5:649-660.

Döpfer D, Nederbragt H, Almeida RA, Gaastra W. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of Escherichia coli isolated from persistent bovine mastitis. Vet Microbiol. 2001; 80: 285-296.

Faherty CS, Maurelli AT. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. Trends in Microbiol. 2008; 16: 173-180.

Funke G, Bernard AK. Coryneform Gram-positive rods. In Manual of Clinical Microbiology ed. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry M.L. & Pfaller, M.A. pp. 485–514. Washington DC, USA: ASM Press.

Ghosh S, Pal S, Das S, Dasgupta SK, Majumdar S. Lipoarabinomannan induced cytotoxic effects in human mononuclear cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998; 21: 181–188.

Henics T, Wheatley DN. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. Biol Cell. 1999; 91: 485-498.

Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E. Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996; 15:624–632

Hirata Jr R, Souza, SMS, Rocha-De-Souza, CM, Andrade AFB, Monteiro-Leal LH, Formiga LCD, Mattos-Guaraldi AL. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. Microb Pathog.2004; 36:125-130.

Hirata R, Napoleão F, Monteiro-Leal LH, Andrade AF, Nagao PE, Formiga LC, Fonseca LS, Mattos-Guaraldi AL. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. FEMS Microbiol Lett. 2002; 215:115-119.

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; 73:65-68.

Martins C, Faria L, Souza M, Camello T, Velasco E, Hirata R Jr, Thuler L, Mattos-Guaraldi A. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:905-913.

Menzies B, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by Endothelial Cells Induces Apoptosis. Infect Immun. 1998; 66: 5994–5998.

Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. Crit Rev Oral Biol Med. 1997; 8: 389-409.

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; 69:5907-5913.

Moreira LO, Andrade AFB, Vale MD, Mattos-Guaraldi AL. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:5907-5913.

Moyad TF. Two-stage Arthroplasty for the Treatment of Chronic Osteomyelitis After Routine Arthroscopic Knee Surgery.Orthopedics. 2013;36:109-112.

Olender A, Niemcewicz M. Macrolide, lincosamide, and streptogramin B-constitutive-type resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from upper respiratory tract specimens. Microb Drug Resist. 2010; 16: 119-122.

Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Bettencourt R, Almeida J, Martins M, Kristiansen J E, Molnar J, Amaral L. Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47:917–922.

Rajan S, Cacalano G, Bryan R, Ratner AJ, Sontich CU, van Heerckeren A. *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors. Am J Resp Cell Mol Biol. 2000; 23:304-312.

Martin Hausmann. Review Article How Bacteria-Induced Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells Contributes to Mucosal Inflammation. International Journal of Inflammation. 2010; 2010:1-5.

Sabbadini PS, Assis MC, Trost E, Gomes DL, Moreira LO, dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Azevedo VA, Hirata Júnior R, dos Santos AL, Tauch A,Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. Microb Pathog. 2012; 52: 165-176.

Santos CS, dos Santos LS, de Souza MC, dos Santos Dourado F, de Souza de Oliveira Dias AA, Sabbadini PS, Pereira GA, Cabral MC, Hirata Junior R, de Mattos-Guaraldi AL. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. Microbiol Immunol. 2010;54:1-10.

Souza MC, Santos LS, Gomes DL, Sabbadini OS, Santos CS, Camello TC, Asad LM, Rosa AC, Nagao PE, Hirata Júnior R, Mattos-Guaraldi AL. Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107:486-493.

Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. J Immunol Methods. 2000; 243:167-190.

von Graevenitz A, Punter-Streit V, Riegel P, Funke G. Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals. J Clin Microbiol 1998; 36: 2087-2088.

Zylchinsky A., Sansonetti P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. J. Clin. Invest. 1997; 100:493–495.

4 **DISCUSSÃO**

Durante vários anos, *C. pseudodiphtheriticum* tem sido implicado como causa de uma ampla variedade de infecções em pacientes imunocomprometidos, podendo acometer indivíduos de diferentes grupos etários (LaRocco *et al*., 1987; Cimolai *et al*. 1992; Izurieta *et al*. 1997; Ahmed *et al*., 1995; Gutierrez-Rodero *et al*., 1999; Bittar *et al*., 2010); embora na maioria das oportunidades tenha sido isolado de adultos em idade ativa, diversos casos de infecções graves entre os idosos têm sido descritos (Morris & Guild, 1991; Chiner *et al*., 1999; Li & Lal, 2000; Chudnicka *et al*., 2003; Szmygin-Milanowska *et al*., 2003; Kemp *et al*., 2005; Gompelmann *et al*., 2011; Nhan *et al*., 2012). Similarmente, no presente estudo, aproximadamente 10% de isolados clínicos foram obtidos de pacientes idosos, a partir da urina, trato respiratório inferior e fluido peritoneal.

Apesar de existirem poucos casos notificados de infecção relacionada com crianças (LaRocco *et al*., 1987; Cimolai *et al*., 1992; Izurieta *et al*., 1997; Bittar *et al*., 2010), em nosso estudo cerca de 15% das infecções por *C.pseudodiptheriticum* foram observadas em menores 18 anos de idade (sangue, urina e cateter). Até o momento, nenhum estudo anterior, descreveu essas infecções em recém-nascidos. Curiosamente, 42% das amostras foram isoladas de feridas cirúrgicas, bacteremias em neonatos da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) ou relacionadas ao uso de cateter.

Alguns estudos relatam a prevalência de infecções por *C. pseudodiphtheriticum* em individuos do sexo masculino (Ahmed *et al*., 1995; Gutierrez-Rodero *et al*., 1999). Em nossas investigações não foram observadas diferenças entre os sexos, no entanto, quando considerados os sítios de infecção, o patógeno foi principalmente isolado de urina em mulheres e do trato respiratório inferior em homens.

Contrariamente ao observado em países industrializados, em nosso estudo, cepas *C. pseudodiphtheriticum* foram relacionadas principalmente com infecções nosocomiais ocorridas na UTI, em pacientes de diferentes faixas etárias.

Embora não tivessemos encontrado na literatura disponível, relato de casos envolvidos em quadros de infecção da cavidade abdominal por *C. pseudodiphtheriticum*, durante as nossas investigacões foram observadas cinco cepas isoladas de fluido peritoneal de idosos e adultos com cirrose hepática, insuficiência renal ou AIDS. Apenas uma pequena proporção de amostras (5.3%) foram isoladas a partir de BAL de pacientes com AIDS.

Apesar de a espécie *C. pseudodiphtheriticum* ter sido raramente relatada como um patógeno isolado de pele e feridas cirúrgicas, lesões cutâneas e abscessos (Cantarelli *et al*., 2008), interessantemente, detectamos cepas multirresistentes relacionadas com quadros de feridas cirúrgicas em adultos e de pacientes internados da UTI neonatal.

Apenas um caso de rinossinusite foi previamente descrito (Voiriot *et al*., 1986). Em nosso estudo, quatro amostras de *C.pseudodiphtheriticum* foram isoladas de nasofaringe de adultos com sinais de infecção ou cisto. O micro-organismo também foi isolado a partir de secreções oculares. Segundo alguns autores, o significado de uma cultura positiva em superfícies oculares não deve ser ignorado, uma vez que ceratites e conjuntivites podem ser causadas por *C. pseudodiphtheriticum* (Li & Lal, 2000). Adicionalmente a espécie *C. pseudodiphtheriticum* tem sido associada a quadros de artrite grave (Kemp *et al*., 2005), artrite séptica secundária (Erturan *et al*., 2012) e osteomielite crônica (Moyad, 2013), após cirurgia artroscópica.

Assim, a presença de culturas positivas para *C. pseudodiphtheriticum* obtidas de amostras de pacientes com sinais e sintomas clínicos representativos de infecção bacteriana não deve ser neglicenciada.

Os perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de diversas espécies de corinebactérias, incluindo *C. pseudodiphtheriticum*, não são frequentemente previsíveis (Riegel *et al*., 1996;. Lagrou *et al*., 1998; Soriano *et al*., 1998; Camello *et al*., 2003; Morinaga *et al*., 2010). A variabilidade de resistência de *C. pseudodiphtheriticum* a diversas classes de agentes antimicrobianos enfatiza a necessidade de vigilância contínua, exceto, para a atividade invariável de vancomicina e teicoplanina. A espécie *C. pseudodiphtheriticum* é geralmente susceptível a betalactâmicos, aminoglicosídeos, rifampicina, vancomicina e pode apresentar níveis variáveis de susceptibilidade à ciprofloxacina, lincomicina e tetraciclina. No entanto, foram detectadas recentemente amostras resistentes aos macrolídeos, clindamicina, trimetropima / sulfametoxazol e cloranfenicol (Chudnicka *et al*., 2003; Szmygin-Milanowska *et al*., 2003; Olender & Niemcewicz, 2010).

A emergência da resistência antimicrobiana entre as espécies de *Corynebacterium* também tem sido descrita para penicilina e outros agentes beta-lactâmicos (Riegel *et al*., 1996; Lagrou *et al*., 1998; Soriano *et al*., 1998; Janda, 1999; Camello *et al*., 2003; Cherkasov & Gladysheva, 2010). No presente estudo, a porcentagem de resistência à penicilina e ampicilina variou de 39,8% a 44,2%. Resistência a oxacilina, penicilina e beta-lactamases produzidas por cocos Gram-positivos, atingiu 52,2%, sugerindo um padrão resistente dependente da modificação dos receptores à penicilina, tal como observado a proteínas

ligantes de penicilina de estafilococos e estreptococos. Os dados foram corroborados pelos resultados negativos para a produção de beta-lactamases obtidos para as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* testadas em nosso estudo. De acordo com a resistência a penicilinas, o percentual das amostras estudadas resistentes a cefalosporinas variou de 39,9% a 46%. Além disso, a resistência ao imipenem (43,3%) também foi observada. Nossos dados sugerem que podem existir entre isolados clínicos de *C. pseudodiphtheriticum* um padrão de resistência cruzada aos beta-lactâmicos. Embora a cefotaxima tenha sido uma droga que anteriormente tenha exibido eficácia no tratamento de quadros de pneumonia nosocomial causada por *C. pseudodiphtheriticum*, neste estudo, 37% dos isolados clínicos obtidos de trato repiratório inferior foram resistentes à cefotaxima.

O isolamento, a identificação e o perfil de susceptibilidade de *C. pseudodiphtheriticum* aos agentes antimicrobianos podem fornecer informações úteis para o tratamento dos pacientes (Colt *et al*., 1991; Manzella *et al*., 1995; von Graevenitz *et al*., 1998, Morinaga *et al*., 2010) e enfatizam a necessidade de investigar a virulência expressada pelo micro-organismo, bem como a capacidade dessa espécie colonizar superfícies abióticas e bióticas dentro do contexto do processo infeccioso no hospedeiro.

A adesão microbiana e a formação de biofilme podem representar problemas de Saúde Pública. Mais de 60% das infecções bacterianas tratadas pelos clínicos são consideradas com envolvimento de espécies formadoras de biofilme. Mesmo em indivíduos imunocompetentes, essas infecções são raramente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Considerando o envelhecimento da população e o número cada vez maior de dispositivos médicos implantáveis, espera-se o aumento do número de infecções causadas por patógenos oportunistas, associadas a biofilmes (Stewart & Costerton, 2001; Sousa *et al*., 2011).

A produção de biofilme pelos micro-organismos ocorre, preferencialmente, em superfícies inertes, como dispositivos médicos, mas pode também ocorrer em tecidos vivos, como ocorre em infecções invasivas. O tratamento bem sucedido, nestes casos, a longo prazo, depende de doses elevadas de antibióticos e a remoção de qualquer corpo estranho (Costerton *et al*., 1999; Donlan & Costerton, 2002; Mohamed *et al*., 2004, Fux *et al*., 2005 , Sousa *et al*., 2011).

Para algumas espécies de corinebactérias já foram descritas propriedades adesivas a superfícies bióticas e abióticas e / ou de produção de biofilme, incluindo *C. jeikeium*, *Corynebacterium macginleyi* e *C. diphtheriae* (Wang *et al*., 2001; Kwaszewska *et al*., 2006, Suzuki *et al*., 2007), interessantemente, as amostras estudadas neste trabalho exibiram tais propriedades revelando um padrão de aderência agregativa (AA) previamente associada com

a invasividade e sobrevivência intracelular conforme descrito para outros agentes patogênicos humanos, incluindo *C. diphtheriae* (Hirata Jr *et al*., 2008) e *Escherichia coli* (EAEC) (Pereira *et al*., 2008).

A patogênese das infecções por EAEC, em geral, pode ser dividida em fases, incluindo colonização, aderência e formação de biofilme. A aderência de EAEC pode ser influenciada por fatores diversos que em conjunto contribuem para expressão do fenótipo AA. A capacidade de expressar as fímbrias AA (AAF) e a capacidade de formar biofilme parecem estar relacionadas (Harrington *et al*., 2006; Huang *et al*., 2006, Fujiyama *et al*., 2008). Yanagawa & Honda (1976) relatam que a amostra padrão *C. pseudodiphtheriticum* ATCC10700 possui um grande número de *pili* (dezenas a mais de uma centena em 91-100% das células bacterianas). A presente investigação demonstrou que as amostras *C. pseudodiphtheriticum* AA-like ATCC10700/Faringite e HHC1507/Bacteremia foram capazes de aderir a superfícies abióticas e / ou bióticas e formar biofilmes. Os dados indicaram uma correlação entre o fenótipo AA e a formação de biofilme por cepas de *C. pseudodiphtheriticum*.

Estudos adicionais permanecem necessários para determinar se *pili*, entre outros componentes da superfícies de *C. pseudodiphtheriticum*, estão envolvidos na adesão às superfícies de células epiteliais e / ou aderência às superfícies abióticas.

A adesão primária de bactérias planctônicas é um passo crucial na formação de biofilme, que depende principalmente das características da superfície da célula bacteriana e de parâmetros ambientais (natureza da superfície do material, disponibilidade de substratos, nutrientes etc.) (Stanley & Lazazzera, 2004). A aderência bacteriana aos biomateriais é uma consequência de interações físico-químicas (forças de van der Waals, ácido-base de Lewis, forças electrostáticas) (Rosenberg, 1981) e atividades de proteínas e polissacarídeos de superfície bacteriana (Costerton *et al*., 1999; von Eiff *et al*., 2002; Oliveira *et al*., 2003; Sousa *et al*., 2011).

Amostras produtoras de biofilme, em geral, demonstram maior aderência a superfícies plásticas, em comparação com amostras não produtoras de biofilme. *C. diphtheriae* e espécies lipofílicas de corinebactérias isoladas de pele foram relacionadas com hidrofobicidade e formação de biofilmes em superfícies sólidas (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1999; Kwaszewska *et al*., 2006). Similarmente à *C. diphtheriae*, *Corynebacterium urealyticum* e outras espécies bacterianas (Rosenberg, 1981; Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Soriano *et al*., 2008), foi observada a aderência de *C. pseudodiphtheriticum* ao poliestireno atribuída às interações hidrofóbicas entre as células e a carga negativa da superfície do plástico. No

entanto, as amostras estudadas exibiram diferenças na sua capacidade de produção de biofilmes em superfícies de poliestireno.

Na presente investigação, as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* foram evidênciadas como forte produtoras de biofilme na superfície do vidro. Da mesma forma que a amostra de *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 relacionada ao cateter (Gomes *et al*., 2009), a formação de microcolônias foi verificada para ambas amostras de *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700/Faringite e HHC1507/Bacteremia em superfícies hidrofílicas (vidro) e hidrofóbicas (cateter de poliuretano).

Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas por micro-organismos consistem em uma mistura complexa de biopolímeros, principalmente constituídos por polissacarídeos, bem como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e de substâncias húmicas. Contudo, os EPS formam o espaço intercelular dos agregados microbianos, o arcabouço e a arquitetura do biofilme (Vu *et al*., 2009). A aderência de *C. diphtheriae* a superfícies hidrófilas de vidro foi atribuída à presença de moléculas de matriz extracelular, principalmente polissacarídeos com níveis elevados de resíduos de ácido siálico (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Moreira *et al.*, 2003; Gomes *et al*., 2009) .

A formação de microcolônias é uma resposta coordenada e adaptativa que facilita o desenvolvimento continuado e a dispersão do biofilme. O contínuo crescimento dos micro-organismos no biofilme ocorre conduzindo à formação de densos agregados bacterianos incorporados à matriz exopolimerica rodeado por uma rede de canais, típicos de biofilmes maduros (O'Toole *et al*., 2000; Webb *et al*., 2003).

Conforme descrito anteriormente por Karatan & Watnick (2009) e Webb *e* colaboradores (2003) para *V. Cholerae* e *P. aeruginosa*, imagens de CLSM do biofilme de *C. pseudodiphtheriticum* revelaram microcolônias com bactérias viáveis e bactérias mortas. Adicionalmente o método Live/Dead revelou o arranjo espacial das células e indicou a presença de porosidade e de canais ao longo do biofilme produzido pelas amostras estudadas. Os dados sugerem que a morte de células no interior de microcolônias pode desempenhar um papel na diferenciação e subsequente dispersão de uma subpopulação de células sobreviventes de biofilme produzido por *C. pseudodiphtheriticum*. No entanto, o (s) mecanismo (s) pelo (s) qual (is) os canais foram criados dentro microcolônias e as células dispersam dentro de biofilmes maduros necessita de mais investigação.

As cepas de *C. pseudodiphtheriticum* estudadas produziram biofilme em superfícies abióticas, incluindo dispositivos médicos de poliuretano. Os poliuretanos são normalmente usados em várias aplicações médicas, incluindo cateteres e tubos para fins gerais, de cama

hospitalar, lençóis cirúrgicos e curativos (Donlan & Costerton, 2002; Donlan, 2008). Os dispositivos médicos podem diferir entre si no que diz respeito a concepção e as características de uso, apesar disso existem fatores específicos que determinam a susceptibilidade de um dispositivo para a contaminação microbiana e a formação de biofilme. Os números e tipos de organismos aos quais o dispositivo está exposto, a composição do meio dentro ou sobre o dispositivo e propriedades do material do dispositivo, todos esses fatores podem influenciar na formação de biofilme.

Diversos trabalhos indicam que o aumento da síntese de exopolissacárido está, muitas vezes, relacionado com espécies bacterianas produtoras de biofilme em cateteres associados com infecções sintomáticas (Olson *et al*., 2002). Uma grande quantidade de material de biofilme exibindo microcolônias bacterianas e material amorfo foi observado na superfície e interior do cateter de poliuretano infectados *in vitro* com *C. pseudodiphtheriticum*.

Assim como outros agentes patogênicos Gram-positivos e *C. diphtheriae* (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991; Gomes *et al*, 2009) a aderência de *C. pseudodiphtheriticum* a poliuretano pode ser parcialmente explicada pelas cargas positivas associados com este polímero. A substância amorfa depositada ou glicocálice observada circundante às microcolônias de *C. pseudodiphtheriticum* nas superfícies interna e externa do cateter de poliuretano reforça o fato de que as bactérias podem produzir ou atrair componentes exopoliméricos que fortalecem a sua ligação com superfícies inertes *in vitro*.

Conforme descrito por Franson e colaboradores (1984) para estafilococos coagulase negativos, nossos resultados sugerem que a espécie *C. pseudodiphtheriticum*, podem invadir os tecidos do hospedeiro a partir de fontes exógenas ou endógenas, através de uma ferida na inserção do cateter e migrarem ao longo da superfície externa do cateter e eventualmente colonizar o segmento de cateter. Em ambientes naturais, as bactérias aderem principalmente à camada de moléculas adsorvidas, que reveste as superfícies inertes. *In vivo*, qualquer superfície de material é rapidamente coberta por plasma e proteínas de matriz para a qual as bactérias podem expressar adesinas específicas (Whittaker *et al*., 1996, Arciola *et al*., 2005). A estimulação da formação de biofilme bacteriano por proteínas exógenas de mamíferos tem sido relatada em muitos patogénios humanos (Akiyama *et al*., 1997, Bonifait *et al*., 2008).

A fibronectina (Fn) é uma glicoproteína encontrada em forma solúvel em muitos fluidos corporais (sangue, saliva) e em forma insolúvel, como um componente da superfície celular, membranas basais e da matriz extracelular. A Fn solúvel em plasma interage com várias bactérias e pode servir como um receptor na adesão das bactérias às células hospedeiras epiteliais.

A capacidade das bactérias de interagir com vários domínios diferentes na molécula de Fn pode desempenhar um papel importante na aderência bacteriana e no tropismo por tecidos (Hynes, 1990). Investigações recentes relatam que pelo menos 10 proteínas diferentes de *E. coli* ligam a Fn, levando a internalização de *E. coli* por células hospedeiras humanas, incluindo células epiteliais (Henderson *et al*., 2011).

Para outro patógeno bem conhecido, *S. aureus*, a Fn é alvo de bactérias através de receptores de Fn (FnBPs) que estão ancorados na parede celular bacteriana deste micro-organismo, interações que podem desempenhar um papel importante no processo de infecção. Estudos anteriores têm demonstrado que FnBPs não só podem mediar a adesão bacteriana às células hospedeiras, mas também a adsorção de bactérias por células e formação de biofilme (Schwarz-Linek *et al*., 2003). O'Neill e colaboradores (2008) relatou que o biofilme promovido por FnBP ocorreu ao nível da acumulação intracelular e ligação não primária à Fn ou Fbg.

Muitas bactérias patogênicas exploram os mecanismos envolvidos nos sistemas de coagulação para colonizar tecidos com proteínas de matrix expostas ou fugir dos mecanismos imunológicos.

O fibrinogénio (Fbg), é uma grande proteína humana plasmática e é principalmente envolvida no sistema de cascata de coagulação através da sua conversão em fibrina insolúvel. A síntese do Fbg é regulada durante a inflamação ou sob exposição a stresses, tais como infecções sistêmicas. Ambos Fbg e fibrina desempenham sobrepostos papéis na coagulação do sangue, na resposta a fibrinólise inflamatória, nas interações celulares e da matriz e cicatrização de feridas (Cheung *et al*., 1991; Davis *et al*., 2001; Mosesson, 2005).

Uma análise comparativa do biofilme de proteoma de *S. aureus* de e células planctônicas evidênciou que as células do biofilme expressaram níveis elevados de proteína associada com a ligação de células e, em particular, receptores de Fbg (Resch *et al*., 2006). Para *Streptococcus suis*, a propriedade de ligação ao Fbg permitiu prender as bactérias umas às outras através Fbg mediado por cross-brindging (Bonifait *et al*., 2008) contribuindo para a formação de biofilme. A ligação de Fbg a *Streptococcus agalactiae* desempenhou um papel significativo na prevenção da fagocitose (Tenenbaum *et al*., 2005).

Semelhante aos dados encontrados em trabalhos com *C. diphtheriae* (Souza *et al*., 2004, Gomes *et al*., 2009, Sabbadini *et al*., 2010), a capacidade de cepas de *C. pseudodiphtheriticum* interagir com a Fn e com o Fbg foi demonstrada neste estudo. Curiosamente, Fn e o Fbg interagiu com menor afinidade para a amostra isolada de sangue (HHC1507/Bacteremia). As propriedades de interação com a Fn e com o Fbg, possivelmente

favoreceram a aderência à superfície do epitélio respiratório pela amostra ATCC 10700/Faringite. Os dados sugerem que a interação com a Fn e com o Fbg podem apresentar uma natureza multifatorial e relevância na promoção, fixação de *C. pseudodiphtheriticum* nas células epiteliais hospedeiras, nos tecidos danificados e / ou coágulos de sangue, tal como anteriormente observado para outros agentes patogênicos Gram-positivos (Bonifait *et al*., 2008; O'Neill *el al*., 2008).

Além da capacidade de produção de biofilme diretamente em superfícies hidrófilas e hidrófobas abióticas, a produção de biofilme por *C. pseudodiphtheriticum* foi observada na presença de Fbg e Fn. No entanto, os isolados clínicos responderam inversamente, na presença de Fbg e / ou Fn ligados à superfície sólida. A formação de biofilme pela amostra ATCC10700/Faringite foi mais eficiente nas superfícies de poliestireno revestidas com Fbg e / ou Fn e ocorreu redução do biofilme formado pela amostra HHC1507/bacteremia, quando comparada com a formação de biofilmes em superfícies não revestidas. Assim, a expressão de adesinas que interagem com Fbg e Fn em diferentes níveis podem estar implicados na formação de biofilme por cepas de *C. pseudodiphtheriticum*, como previamente relatado para *S. suis* (Bonifait *et al*., 2008).

A afinidade para Fbg e Fn humana e a capacidade de formação de biofilme em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas abióticas parece se uma característica da patogenicidade de *C. pseudodiphtheriticum* que pode estar contribuindo para o estabelecimento e disseminação da infecção no hospedeiro.

O comportamento de um micro-organismo dentro das células epiteliais fornece algumas indicações sobre sua estratégia geral de patogenicidade. A aderência bacteriana às estruturas das células de mucosas e epiteliais é importante não só para a persistência microbiana nas vias aéreas, mas também para sua disseminação sistêmica (Riise *et al*., 2000). Além disso, a internalização de bactérias por células epiteliais indica que essas espécies desenvolveram mecanismos especializados que atraem funções celulares normais de acolhimento e estímulo ao seu consumo próprio e adaptação ao meio intracelular (Meyer *et al*., 1997).

Organismos infecciosos são frequentemente introduzido na célula por endocitose. A vacuolização citoplasmática e degradação sugerem a morte das células infectadas, o que poderia fornecer uma rota para a disseminação de microorganismos para locais próximos e/ou distantes, onde focos de infecção metastática poderiam ser estabelecidos (Henics & Wheatley, 1999).

Estudos anteriores demonstraram que os bacilos da difteria podem entrar nas células epiteliais através de uma íntima adesão com as membranas celulares, bem como comprovam a presença de bactérias no interior vacúolos (Hirata *et al*., 2002). A presente investigação demonstrou que durante a invasão de células HEp-2, numerosas bactérias *C. pseudodiphtheriticum* estão presentes dentro de um vacúolo ligada à membrana única, concomitante ao desprendimento de células epiteliais. Estes mecanismos podem ser relevantes para em infecções *in vivo*, permitindo que amostras da espécie *C. pseudodiphtheriticum* possam romper a barreira de células epiteliais e entrar nos tecidos mais profundos.

As amostras de *C. pseudodiphtheriticum* estudadas associadas com infecção humana demonstraram variações na sua capacidade de se replicar no ambiente extracelular e sobreviver na presença de células HEp-2. Os resultados sugerem também que as cepas de *C.pseudodiphtheriticum* não só multiplica e permanece sobre a superfície do hospedeiro, mas também podem utilizar a sua ligação às células epiteliais, como um passo essencial para atingir a tecidos mais profundos ou a outros locais.

Durante a infecção, muitas bactérias patogênicas modulam o citoesqueleto de actina das células hospedeiras eucarióticas para facilitar diversos processos infecciosos, tais como a fixação ou a invasão das células epiteliais. As bactérias enteropatogênica são as mais estudadas neste âmbito da pesquisa e estas usurpam microfilamentos da célula hospedeira para a sua entrada (Chu & Lu 2005).

A entrada de um patógeno em células não fagocíticas envolve a ativação de mecanismos de transdução de sinal para induzir a rearranjos do citoesqueleto hospedeiro, facilitando assim a absorção celular bacteriana. A ativação da atividade da tirosina-quinase é uma característica comum das vias de transdução do sinal que conduzem à internalização de patógenos invasivos (Finlay *et al*., 1991; Tan *et al*., 1998).

No processo de invasão de *C. pseudodiphtheriticum*, a ligação da bactéria desencadeia um sinal na célula epitelial induzindo a reorganização dos componentes do citoesqueleto, que circundam o organismo e proporcionam a força necessária para a adsorção bacteriana. No entanto, as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* mostraram habilidades variadas para acionar os mecanismos de transdução de sinal para induzir esses rearranjos do citoesqueleto hospedeiro, durante seus processos de invasão. Rearranjo do citoesqueleto parecia ser parcialmente provocado por ativação de tirosina-cinases. Além disso, amostras de *C. pseudodiphtheriticum* podem gerar microfilamentos independentes de vias para a adsorção bacteriana, tal como anteriormente observado entre outros agentes patogênicos humanos (Meyer *et al*., 1997).

A adesão e a persistência intracelular nas células HEp-2 foram elevadas na amostra piliada de *C.pseudodiphtheriticum* ATCC 10700. Ao contrário de *C. diphtheriae* (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1991), as amostras *C. pseudodiphtheriticum* avaliadas neste estudo foram incapazes de aglutinar eritrócitos humanos. Assim, nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, as adesinas de *C. pseudodiphtheriticum* com afinidade para as células HEp-2 foram incapazes de atuar como hemaglutininas para as hemácias íntegras. As diferenças observadas na capacidade destas cepas para aderir, entrar e sobreviver no interior das células hospedeiras sugerem uma diversidade qualitativa e / ou quantitativa na expressão dos componentes bacterianos que funcionam como adesina (s) e / ou invasina (s).

Em vários estudos, verdadeiros patógenos oportunistas foram classificados de acordo com os seus padrões de aderência em cultura células. O padrão de aderência AA foi reconhecido nas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, que estão associadas com colite neonatal em ambiente hospitalar (Livrelli *et al*., 1996).

Para *Escherichia coli* diarreiogênica, a associação de padrões de aderência com as diferentes síndromes clínicas tem sido bem estabelecida (Nataro & Kaper, 1998). Estudos prévios demonstraram que as propriedades AA de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e de amostras de *C. diphtheriae* (Hirata Jr *et al*., 2008) frente às células epiteliais cultivadas foram associadas com a capacidade de invasão e sobrevivência intracelular (Pereira *et al*., 2008). Todas as cepas de *C. pseudodiphtheriticum* testadas apresentaram um padrão de aderência diferente dos bacilos da difteria caracterizado por um padrão AA -Like, independentemente da origem do isolado. Do mesmo modo que EAEC, dois isolados clínicos de *C. pseudodiphtheriticum* (faringite ATCC10700/exudative e HTR1503/pneumonia) apresentaram propriedades adesivas AA-like associadas com a invasão e a persistência intracelular. A amostra HHC1507/bacteremia AA-like foi incapaz de persistir no compartimento intracelular e bactérias viáveis foram observadas apenas nos sobrenadantes. Estes dados sugerem que existem diferenças nos mecanismos de patogenicidade das cepas de *C. Pseudodiphtheriticum* estudadas.

Patogénios extracelulares, tais como *E. coli* uropatogênicas (Mulvey *et al*., 2001) e *Helicobacter pylori* (Necchi *et al*., 2007), têm sido demonstrados colonizando transitoriamente o ambiente intracelular do epitélio de mucosa, como estratégia para a persistência a longo prazo. Assim, a capacidade das bactérias para sobreviver no interior das células hospedeiras, pode servir para intensificar a patogenicidade de *C. pseudodiphtheriticum*.

A utilização do espaço intracelular por *C. pseudodiphtheriticum* poderia ser um meio de sobrevivência sob condições adversas extracelulares. Os microrganismos testados foram diferencialmente capazes de entrar e persistem por longos períodos de tempo dentro das células epiteliais humanas. A Internalização bacteriana por células epiteliais indica que essas espécies desenvolveram mecanismos especializados que se associam as funções normais da célula hospedeira e estimulam o seu consumo próprio e adaptação ao meio intracelular (Meyer *et al*., 1997).

A persistência e sobrevivência intracelular de *C. pseudodiphtheriticum* no epitélio também podem contribuir para a manutenção do agente patogênico no organismo humano, uma vez que estaria protegido dos mecanismos de controle imunitário do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos utilizados na terapia, tal como anteriormente observado em estudos que relatam a sobrevivência de *Staphylococcus aureus* dentro de células endoteliais (Menzies & Kourteva, 1998). As propriedades autoagregativas e hidrofóbicas expressadas por *C. pseudodiphtheriticum* podem ajudar a enganar a defesa imunológica e, conseqüentemente, favorecer a fixação e sobrevivência do micro-organismo nas superfícies cutâneas e / ou mucosas.

A apoptose, é um processo ativo, que requer ativação de proteínas da própria célula para a ocorrência da morte celular (Kerr *et al*., 1972) e reúne um padrão de alterações morfológicas associado à morte celular programada, quer por células imunocompetentes, que por células epiteliais. No entanto, a apoptose pode ser uma estratégia de agente patogênico microbiano para escapar a partir da célula hospedeira infectada permitindo invadir as camadas mais profundas da mucosa para a colonização bacteriana prolongada (Martin, 2010).

As células epiteliais da mucosa pode responder às bactérias por vários mecanismos diferentes (Zylchinsky & Sansonetti 1997; Herard *et al.*, 1996). Ao contrário de outras superfícies mucosas, o epitélio respiratório é altamente resistente à apoptose, e esta resposta é ativada apenas quando as condições apropriadas epiteliais estão presentes, bem como as cepas patogênicas de bactérias capazes de expressar adesinas e citotoxinas coordenadamente (Rajan *et al*., 2000).

Os mecanismos de morte celular induzidos por amostras de *C. pseudodiphtheriticum* estudadas parecem ser semelhantes aos descritos previamente para cepas de *C. diphtheriae* não toxigénicas (Santos *et al*., 2009). A formação de corpos apoptóticos, alterações na permeabilidade da membrana e uma redução significativa na viabilidade das células HEp-2 sugerem uma apoptose tardia ou necrose secundária 24 h pós-infecção com *C. pseudodiphtheriticum*. Similarmente, as espécies *Mycobacterium tuberculosis* (Danelishvili *et*

al., 2003) e *C. diphtheriae* (Sabbadini *et al*., 2012), *C. pseudodiphtheriticum* induziu tanto apoptose e necrose em células epiteliais humanas. As cepas de *C. pseudodiphtheriticum* desenvolveram mecanismos para promover a sua sobrevivência e reprodução, bem como estratégias para exercer a apoptose e necrose em células epiteliais humanas, um passo essencial para chegar a tecidos mais profundos ou outros sítios.

É provável que o pequeno número de casos clínicos em países industrializados relatados na literatura não reflitam o verdadeiro panorama da incidência de *C. pseudodiphtheriticum* em infecções humanas em todo o mundo. Além disso, uma triagem universal para este organismo ainda tem sido um desafio na rotina de muitos laboratórios.

Já está claro que os processos utilizados por esta bactéria "oportunista" imitam aqueles utilizados por um grupo de conhecidos patógenos humanos invasivos. Possivelmente as características descobertas e evidênciadas neste trabalho ressaltam que os mecanismos de patogenicidade do *C. pseudodiphtheriticum* não devem ser subestimados, especialmente quando este micro-organismo estiver envolvido em quadros infecciosos invasivos, inclusive em pacientes que fazem uso de dispositivos médicos e/ou imunocomprometidos. A presente investigação aponta para a necessidade de estudos mais aprofundados acerca de uma identificação molecular mais ampla dessas amostras e de propagação deste micro-organismo em outras células do hospedeiro, além das células Hep-2, envolvidas na resposta à patogênese destas infecções. Nesse sentido, esforços já vêm sendo direcionados para a identificação molecular por sequenciamento das cepas de *C. pseudodiphtheriticum* estudadas, pesquisa dos processos de interação dessas amostras com células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e macrófagos humanos U937, a interação com outra molécula de MEC, o colágeno, tendo em vista o relevante papel da mesma na produção de biofilme e sua potencial participação na persistência e/ou propagação deste micro-organismo no hospedeiro. Sendo assim, tais aspectos constituem estratégias em andamento em projetos conjuntos com pesquisadores de diferentes Instituições de Pesquisa no Brasil e no exterior.

CONCLUSÕES

- ⇨ O isolamento de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* de infecções graves, com elevada mortalidade em pacientes imunocomprometidos e a ocorrência de fenótipos multirresistentes foram observados na região metropolitana do Rio de Janeiro. Os profissionais de saúde devem permanecer alertas para a possibilidade de ocorrência de novos casos de infecções por *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, o que certamente levará um aumento do número de relatos em áreas metropolitanas de países em desenvolvimento;

- ⇨ Apesar das diferentes origens, todas as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* exibiram padrão de aderência do tipo agregativo-like. A expressão deste tipo de padrão de aderência pode ser considerado como fator sugestivo do potencial invasivo de amostras de *C. pseudodiphtheriticum*;

- ⇨ Em adição à capacidade de expressão do padrão de aderência do tipo agregativo-like, as amostras apresentaram capacidade de aderir a superfícies abióticas e /ou bióticas e formar biofilme;

- ⇨ *C. pseudodiphtheriticum* exibiu diferenças na capacidade de aderir ao poliestireno. Este mecanismo parece ser atribuído às interações hidrofóbicas entre a bactéria e a carga negativa da superfície do plástico.

- ⇨ Todas as amostras testadas foram identificadas como forte produtoras de biofilme em superfícies hidrofílicas (vidro) e hidrofóbicas (poliuretano).

- ⇨ *C. pseudodiphtheriticum* pode causar infecções relacionadas ao uso de cateter, particularmente em pacientes imunocomprometidos, incluindo os idosos e portadores

de neoplasias. Todas as amostras estudadas foram capazes de aderir ao cateter de poliuretano nas condições experimentais utilizadas neste estudo;

- ⇨ O biofilme formado na superfície hidrofílica do vidro foi caracterizado por microcolônias com bactérias viáveis com membranas intactas e bactérias mortas com membranas danificadas o que pode desempenhar um papel na diferenciação e subsequente dispersão de uma subpopulação de células sobreviventes de biofilme formado por *C. pseudodiphtheriticum;*

- ⇨ As amostras de *C. pseudodiphtheriticum* interagiram com Fn e Fbg humano em diferentes intensidades;

- ⇨ *C. pseudodiphtheriticum* foi capaz de formar biofilme em superfícies inertes, porém os isolados clínicos responderam inversamente, na presença de Fbg e / ou Fn ligados à superfície sólida. A formação de biofilme pela amostra isolada de faringite foi mais eficiente nas superfícies de poliestireno revestidas com Fbg e / ou Fn e ocorreu redução do biofilme formado pela amostra isolada de sangue, quando comparada com a formação de biofilmes em superfícies não revestidas;

- ⇨ As amostras associadas com infecções humanas demonstraram variações na capacidade de invadir, replicar no ambiente extracelular e sobreviver na presença de células epiteliais humanas sugerindo uma diversidade quantitativa e/ou qualitativa na expressão dos componentes bacterianos que funcionam como adesina (s) e/ou invasina (s);

- ⇨ No processo de invasão de *C. pseudodiphtheriticum* a ligação bacteriana aciona os mecanismos de transdução de sinal na célula epitelial, induzindo a reorganização dos componentes do citoesqueleto, que circundam o organismo e proporcionam a força necessária para a absorção bacteriana;

- ⇨ As amostras de *C. pseudodiphtheriticum* investigadas apresentaram variações na habilidade de acionar os mcanismos de transdução de sinal para induzir o rearranjo do citoesqueleto hospedeiro;

- ⇨ A adesão e a persistência intracelular em células HEp-2 foram elevadas na amostra piliada ATCC10700 de *C. pseudodiphtheriticum*;

- ⇨ As cepas estudadas isoladas de infecções invasivas induziram apoptose (tardia) e necrose em células epiteliais humanas;

- ⇨ As cepas *C. pseudodiphtheriticum* com potencial invasor, associadas a pacientes imunocomprometidos parecem estar utilizando os mecanismos de patogenicidade evidênciados nesta investigação, tais como, adesividade às superfícies abióticas e bióticas, formação de biofilme, invasão e indução de apoptose, para promover a sua sobrevivência e reprodução no hospedeiro, um passo crucial para o estabelecimento da infecção.

REFERÊNCIAS

Ahmed K, Kawakami K, Watanabe K, Mitsushima H, Nagatake T, Matsumoto K. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. Clin Infect Dis 1995; 20:41-46.

Akiyama H, Ueda M, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin. J Dermatol Sci 1997; 16: 2-10.

Allison DG, Ruiz B, Sanjose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas* fluorescens biofilms. FEMS Microbiol Lett.

Almeida MAC. Fibrinogênio como marcador de trombose. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2006.

Andavolu RH, Jagadha V, Lue Y, McLean T. Lung abscess involving *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. N Y State J Med 1986; 86:594-596.

Anderson DE, Rings DM, Kowalski J. Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in five alpacas. Journal of the American Veterinary Medicine Association 2004; 225:1743–1747.

Archibald LK, Gaynes RP. Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. Nosocomial Infect 1997; 11: 245-255.

Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. Prevalence of cna, fnbA and fnbB adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. FEMS Microbiol Lett 2005; 246: 81-86.

Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol 1999. 11: 255-260.

Babay HÁ, Kambal AM. Isolation of coryneform bacteria from blood cultures of patients at a University Hospital in Saudi Arabia. Saudi Med J 2004; 8:1073-1079.

Baquero F. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1997; 39: 1–6.

Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endossome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect Immun 1998; 66: 336-342.

Bayston R, Compton C, Richards K. Production of extracellular slime by coryneform colonizing hidrocephalus shunts. J. Clin. Microbiol 1994; 32: 1705-4.

Beg AM, Jones MN, Miller-Torbert T, Holt RG. Binding of Streptococcus mutans to extracellular matrix molecules and fibrinogen. Biochem Biophys Res Commun 2002; 298:

75-79.

Biswas D, Itoh K, Sasakawa C. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. Microbiol Immunol. 2003; 47: 469-473.

Bittar F, Cassagne C, Bosdure E, Stremler N, Dubus JC, Sarles J, Reynaud-Gaubert Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. M, Raoult D, Rolain JM. Emerg Infect Dis 2010;16:1231-1236.

Bliska JB, Galan JE, Falkon S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. Cell 1993; 73:903-920.

Bonifait L, Grignon L, Grenier D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. Applied and Environ Microbiology 2008; 74: 4969–4972.

Bower CK, Mc Guire J, DaescheL MA. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. Trends in Food Science & Technology 1996; 7: 152-157.

Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 1995; 60:2355–2359.

Boyd AP, Ross PJ, Conroy H, Mahon N, Lavelle EC, Mills KH. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. J Immunol 2005; 175: 730-738.

Braga WU, Chavera A, Gonzalez A. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in highland alpacas (Lama pacos) in Peru. Veterinary Record 2006; 159: 23–24.

Brennan M, Loughman A, Devocelle M, Arasu S, Chubb A, Foster T, Cox D. Elucidating the role of *Staphylococcus epidermidis* serine-aspartate repeat protein G in platelet activation. J Thromb Haemost 2009; 7: 1364-1372.

Burke GJ, Malouf MA, Glanville AR. Opportunistic lung infection with *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* after lung and heart transplantation. Med J Aust 1997; 166:362-364.

Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Nondiphtherial *Corynebacterium spp* isolated from clinical specimens of patients in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Microbiol 2003; 34: 39-44.

Camello TCF, Souza MC, Martins CA, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. Lett Appl Microbiol 2009; 48: 458-464.

Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? J Cell Sci 2002; 115: 4727-4734.

Cantarelli VV, Brodt TC, Secchi C, Inamine E, Pereira FS.Cutaneous infection caused by

Corynebacterium pseudodiphtheriticum: a microbiological report. Rev Inst Med Trop 2008; 50: 51-52.

Carlsson F, Sandin C, Lindahl G. Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway. Mol Microbiol 2005; 56: 28–39.

Cauda R, Tamburrini E, Ventura G, Ortona L. Effective vancomycin therapy for *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* endocarditis. South Med J 1987; 80: 1598.

Chen G, Sordillo EM, Ramey WG, Reidy J, Holt PR, Krajewski S, Reed JC, Blaser MJ, Moss SF. Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increase expression of BAK. Biochem Bioph Res Commun 1997; 239: 626-632.

Chen Y, Zychlinsky A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. Microb Pathog 1994; 17: 203-212.

Cherkasov SV, Gladysheva IV [Antibiotic resistance of coryneform bacteria isolated from the reproductive tract of women].Antibiot Khimioter 2010; 55:45-49.

Cheung AL, Krishnan M, Jaffe EA, Fischetti VA. Fibrinogen acts as a bridging molecule in the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells. J Clin Invest 1991; 87: 2236-2245.

Chiner E, Arriero JM, Signes-Costa J, Marco J, Corral J, Gomez-Esparrago A, Ortiz dlT, V, Martin C. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunocompetent patient. Monaldi Arch. Chest Dis 1999; 54:325-327.

Chmieleswski RAN & Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2003; 2: 22-30.

Chu WH, Lu CP. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of EPC cells *Aeromonas hydrophyla*. J Vet Med 2005; 52:180-182.

Chudnicka A, Koziol-Montewka M. Characteristics of opportunistic species of the *Corynebacterium* and related coryneforms isolated from different clinical materials. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med] 2003; 58(1):385-391.

Chudnicka A, Szmygin-Milanowska K, Kieszko R, Milanowski J, Koziol-Montewka M. The role of opportunistic species of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in the pathogenesis of CAP (Community Acquired Pneumonia). Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med.] 2003; 58:142-148.

Cimolai N, Rogers P, Seear M. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonitis in a leukaemic child. Thorax 1992; 47:838-839.

Cohen Y, Force G, Gros I, Canzi AM, Lecleach L, Dreyfuss D. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pulmonary infection in AIDS patients. Lancet 1992; 340:114-115.

Collins MD, Bernard KA, Hutson RA, Sjoden B, Nyberg A, Falsen E. *Corynebacterium* sundsvallense sp. nov., from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1999; 2:361-366.

Collins MD, Falsen E, Akervall E, Sjoden B, Alvarez A. *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel *Corynebacterium* that does not contain mycolic acids. Int J Syst Bacteriol 1998; 4:1449-1454.

Colombo AV, Hirata Jr R, Souza CMR, Monteiro-Leal LH, Previato JO, Formiga LCD, Andrade AFB, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* surface protein as adhesion to human erytrocytes. FEMS Microbiol Lett 2001; 197: 235-239.

Colt HG, Morris JF, Marston BJ, Sewell DL. Necrotizing tracheitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: unique case and review. Rev Infect Dis 1991; 13:73-76.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284:1318–1322.

Courtney HS, Dale JB, Hasty DL. Mapping the fibrinogen- binding domain of serum opacity factor of group a streptococci. Curr Microbiol 2002; 44: 236–240

Courtney HS, Hasty DL, Dale JB. Anti-phagocytic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*: binding of fibrinogen to M-related protein. Mol Microbiol 2006; 59: 936–947.

Coyle MB, Lipsky BA. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Clin Microbiol Rev 1990; 3:227-246.

Craig TJ, Maguire FE, Wallace MR. Tracheobronchitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. South Med J 1991; 84:504-506.

Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ, Bermudez LE. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. Cell Microbiol 2003;5:649-660.

Darmstadt GL, Mentele L, Fleckman P, Rubens CE. Role of keratinocyte injury in adherence of *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun 1999; 67: 6707-6709.

Davey ME, O'Toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2000; 64: 847–867.

Davies DG, PArsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 1998; 280: 295–298.

Davis S, Gurusiddappa S, Mccrea K, Perkins S, Höök M. SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the Bbeta chain. J Biol Chem 2001; 276: 27799–27805.

Díez-Aguilar M, Ruiz-Garbajosa P, Fernández-Olmos A, Guisado P, Del Campo R, Quereda C, Cantón R, Meseguer MA. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 28.

Donlan RM & Costerton, JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15: 167–193.

Donlan RM. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? Curr Top Microbiol Immunol 2008; 322: 133-161.

Dunne Jr WM. Fibronectin the biological velcro. Clin Microbiol Newsletter 1989; 11: 57-60.

Ellner PD. Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Emerg Infect Dis 1997; 3:242-243.

Ernest E, Koeing W. Fibrinogen and cardiovascular risk. Vasc Med 1997; 2: 115-125.

Erturan G, Holme H, Iyer S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* septic arthritis secondary to intra-articular injection--a case report and literature review. J Med Microbiol 2012; 6:860-863.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol1992; 148: 2207-2216.

Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena HYG, Haeberle H, Houten NV, Gourley WK, Ernst PB, Reys VE. The effect of Class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. J Exp Med 1998; 187: 1659-1669.

Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev 1997; 61: 136-169.

Finlay BB, Ruschkowsk S, Dedhar S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. J Cell Sci 1991;99: 283-296.

Fiorentini C, Fabbri A, Falzano L, Fattorossi A, Matarrese P, Rivabene R, Donelli G. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. Infect Immun 1998; 66: 2660-2665.

Fitzgerald J, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster Tj. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcgammaRIIa receptor. Mol Microbiol 2006; 59: 212–230.

Flick M, Du X, Witte D, Jirousková M, Soloviev D, Busuttil S, Plow E, Degen J. Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. J Clin Invest 2004; 113: 1596-1606.

Franson TR, Shet NK, Rose HD, Sohnle PG. Scanning electron microscopy of bacteria

adherent to intravascular catheters. J Clin Microbiol 1984; 20: 500-505.

Freeman JD, Smith HJ, Haines HG, Hellyar AG. Seven patients with respiratory infections due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Pathology 1994; 26:311-314.

Fujiyama R, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Manago K, Kawano Y. The shf gene of a *Shigella* flexneri homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. Curr Microbiol 2008; 56: 474-480.

Funke G, Efstratiou A, Kuklinska D Hutson RA, Zoysa A De, Engler KH, Collins MD. *Corynebacterium imitans* sp. nov. isolated from patients with suspected diphtheria. J Clin Microbiol 1997a; 35(8): 1978–1983.

Funke G, Hutson RA, Hilleringmann M, Heizmann WR, Collins MD. *Corynebacterium lipophiloflavum sp*. nov. isolated from a patient with bacterial vaginosis. FEMS Microbiol Lett 1997c; 2:219 -224.

Funke G, Lawson PA, Collins MD. *Corynebacterium mucifaciens* sp. nov., an unusual species from human clinical material. Int J Syst Bacteriol 1997b; 4:952-957.

Funke G, Lawson PA, Collins MD. *Corynebacterium riegelii* sp. nov., an Unusual Species Isolated from Female Patients with Urinary Tract Infections. J Clin Microbiol 1998a ; 3: 624–627.

Funke G, Lawson PA, Collins MD. Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris sp*. nov. Int J Syst Bacteriol 1995; 4:735-739.

Funke G, Osorio CR, Frei R, Riegel P, Collins MD. *Corynebacterium confusum* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1998b; 4: 1291-1296.

Funke G, Ramos CP, Collins MD. *Corynebacterium coyleae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1997; 1:92-6.

Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacterias. Clin Microb Rev 1997; 10:125-159.

Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA. Fibrinogen: structure, function, and surface interactions. J Vasc Interv Radiol 2001; 12: 677-682.

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends in Microbiology 2005; 13: 34-40

Galindo CL, Fadl AA, Sha J, Gutierrez C, Popov VL, Boldogh I, Aggarwal BB, Chopra AK. *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin activates mitogen-activated protein kinases and induces apoptosis in murine macrophages and human intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2004; 279: 37597-37612.

Gatner T & Agin P. Plasma fibronectin binds glucose. Biochem Biophys Res Commun 1980; 96: 1147-1154.

Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem 1998; 273:18586–18593

Goldberg MB. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. Microbiol Mol Biol Rev 2001; 65: 595-626.

Gomes DL, Martins CA, Faria LM, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, Souza MC, Alves GB, Rosa AC, Nagao PE, Pereira GA, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi 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.

Gompelmann D, Kappes J, Heussel CP, Schnabel PA, Herth FJ. [*Corynebacterium pseudodiphtheriticum* causing severe pneumonia in secondary immunoglobulin deficiency]. Dtsch Med Wochenschr 2011;136:2503-2506.

Grassme H, Kirschnek S, Riethmueller J, Riehle H, von Kurthy G, Lang F, Weller M, Gulbins L. CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defence to *Pseudomonas aeruginosa*. Science 2000; 290: 527-530.

Grassmé HUC, Ireland RM, Van Putten JPM. Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. Infect Immun 1996; 64: 1621-1630.

Gueirard P, Druilhe A, Pretolani M, Guiso N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. Infect Immun 1998; 66: 1718-1725.

Gutekunst H, Eikmanns B, Reinscheid D. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. Infect Immun 2004; 72: 3495–3504

Gutierrez-Rodero F, Ortiz dlT V, Martinez C, Masia MM, Mora A, Escolano C, Gonzalez E, Martin-Hidalgo A. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: an easily missed respiratory pathogen in HIV-infected patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 33:209-216.

Guyton A & Hall J. Hemostasia e coagulação do sangue. In: Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. Rio de Janeiro: Gauanabara Koogan 1997; 269-276.

Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock J. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. Microbiol 2003; 149: 2701–2707.

Harrington, SM, Dudley, EG, Nataro, JP. Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection. FEMS Microbiol Lett. 2006; 254: 12-18.

Harrison LM, Cherla RP, van den Hoogen C, van Haaften WC, Lee SY, Tesh VL. Comparative evaluation of apoptosis induced by Shiga toxin 1 and/or lipopolyssaccharides in human monocytic and macrophage-like. Microb Pathog 2005; 38: 63-76.

Hartford O, O'Brien L, Schofield K, Wells J, Foster T. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. Microbiol 2001; 147: 2545-2552.

Hemsley C, Abraham S, Rowland-Jones S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*--a skin pathogen. Clin Infect Dis 1999; 29:938-939.

Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA. Fibronectin: a multidomain host adhesion targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. FEMS Microbiol Rev 2011; 35:147-200.

Henics T, Wheatley DN. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. Biol Cell 1999; 91: 485-498.

Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E. Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 199615:624–632

Herwald H, Cramer H, Mörgelin M, Russell W, Sollenberg U, Norrby-Teglund A, Flodgaard H, Lindbom L, Björck L. M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. Cell 2004; 116: 367–379.

Hetts SW. To die or not die. An overview of apoptosis and its role in disease. J Am Med Assoc. 1998; 279: 300-307.

Hirata Jr R, Napoleão F, Monteiro-Leal LH, Andrade AFB, Nagao PE, Formiga LCD, Fonseca LS, Mattos-Guaraldi AL. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. FEMS Microbiol Lett 2002; 215:115-119.

Hirata Jr R, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DL, Damasco PV, Rosa AC, Nagao PE, Pimenta FP, Mattos-Guaraldi AL. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. Braz J Med Biol Res 2008; 41: 986-991.

Hirata Jr R, Souza, SMS, Rocha-De-Souza, CM, Andrade AFB, Monteiro-Leal LH, Formiga LCD, Mattos-Guaraldi AL. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. Microb Pathog 2004; 36(3):125-130.

Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G. Resistance to thromboembolism in PI3Kg-deficient mice. FASEB J 2001; 15: 2019-2021.

Honda E, Yanagawa R. Agglutination of trypsinized sheep erythrocytes by the pili of *Corynebacterium renale*. Infect Immun 1974; 10: 1426-1432.

Huang, DB, Mohanty, A, DuPont, HL, Okhuysen, PC, Chiang, T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. J Med Microbiol 2006; 55: 1303-1311.

Hussain M, Becker K, Von Eiff C, Peters G, Herrmann M. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates clinical and diagnostic laboratory immunology. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 1271-1276.

Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI, Herrmann M. Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. Infect Immun 2002; 70: 2933–2940.

Hussain M, Haggar A, Peters G, Chhatwal GS, Herrmann M, Flock JI, Sinha B. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. Infect Immun. 2008; 76: 5615-5623.

Hynes, R. O. In Fibronectins, edited by A. Rich. Berlin: Springer±Verlag. 1990.
infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages

Inoue M, Seto T, Kawashima H, Matsuda K, Mitsuhashi S. Carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase produced by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. J Antibiot (Tokyo) 1985; 38:1098-1099.

Isberg RR. Uptake of enteropathogenic *Yersinia* by mammalian cells. Curr Top Microbiol Immunol 1996; 209: 1-24.

Ito H, Ono E, Yanagawa R. Comparison of surface hydrophobicity of piliated and non-piliated clones of *Corynebacterium renale* and *Corynebacterium pilosum*. Vet Microbiol 1987 Jun;14(2):165-71.

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; 3:65-68.

Janda WM. The corynebacteria reviewed: New species, identification kits and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Newslett 1999; 21:15-19.

Joh D, Wann Er, Kreikemeyer B, Speziale P, Höök M. The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. Matrix Biol 1999; 18: 211–223.

Kaplan CW, Lux R, Huynh T. Jewett A, Shi W, Haake SK. *Fusobacterium nucleatum* apoptosis-inducing outer membrane protein. J Dent Res 2005; 84: 700-704.

Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Molec Biol Rev 2009; 73: 310-347.

Keane F, Clarke A, Foster T, Weiss A. The N-terminal a domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein a binds to tropoelastin. Biochemistry 2007; 46: 7226–7232.

Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. J Immunol 2000; 164: 2016-2020.

Kellogg JA, Parsey KS. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. Clin Infect Dis 1995; 20:37-40.

Kemp M, Holtz K, Andresen K, Christensen JJ. Demonstration by PCR and DNA sequencing of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a cause of joint infection and isolation of the same organism from a surface swab specimen from the patient. J Med Microbiol 2005; 54:689-691.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972 Aug;26(4):239-57.

Kochi SK and Collier RJ: DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. Exp Cell Res 1993; 208: 296-302.

Korostroff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET. *Actinobacillus actinomycetemicomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. Infect Immun 1998; 66: 4474-4483.

Kostyukova NN, Karas SR. The adhesive activity of diphtheria strains in relation to the characteristic of the infections process they induce. Zh Mikrobiol Epidemiol Immun 1991; 11: 24-27.

Kreikemeyer B, Klenk M, Podbielski A. The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. Int J Med Microbiol 2004; 294: 177-188.

Kwaszewska, AK, Brewczyńska, A, Szewczyk, EM. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. Pol J Microbiol 2006; 55:189-193.

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. Diag Microbiol Infect Dis 1998; 30: 7-15.

LaRocco M, Robinson C, Robinson A. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* associated with suppurative lymphadenitis. Eur J Clin Microbiol 1987; 6:79.

Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Regulated de novo biosynthesis of fibrinogen in extrahepatic epithelial cells in response to inflammation. Thromb Haemost 2004; 92: 234-243.

Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group a streptococci. Applied and Environmental Microbiology 2006; 72: 2864-2875.

Li A, Lal S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* keratitis and conjunctivitis: a case report. Clin Experiment Ophthalmol 2000; 28:60-61.

Liakra K A & Artio-Harmernen H. Distribution of the extracellular matrix proteins tenascin, fibronectin and vibronectin in fetal infant and adult human spleens. J Histochem Cytochem, 1992; 40: 1203-1210.

Liles WC. Apoptosis: role in infection and inflammation. Curr Opin Infect Dis 1997; 10: 165-170.

Lindner PS, Hardy DJ, Murphy TF. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. N. Y. State J Med 1986; 86:102-104.

Linoli O, Marconi S, Garaffa M. Quantitative bacterial ecology of normal nasal mucosa. Ann Sclavo 1981; 23:151-161.

Livrelli V, De Champs C, Di Martino P, Darfeuille-Michaud A, Forestier C, Joly B. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. J Clin Microbiol 1996; 34: 1963-1969.

MacMurdo C, Sande MA. Infective endocarditis in the 21st century. Clin Updates Infect Dis 2000; 5:1-6.

Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9:34–39.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995, 146: 3-15.

Manzella JP, Kellogg JA, Parsey KS. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. Clin Infect Dis 1995; 20:37-40.

Marcil A, Gadoury C, Ash J, Zhang J, Nantel A, Whiteway M. Analysis of PRA1 and its relationship to Candida albicans-macrophage interactions. Infect Immu 2008; 76: 4345-4358.

Marshall RJ, Johnson E. Corinebacteria: incidence among samples submitted to a clinical laboratory for culture. Med Lab Scienc 1990; 47:36-41.

Martaresche C, Fournier PE, Jacomo V, Gainnier M, Boussuge A, Drancourt M. A case of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* nosocomial pneumonia. Emerg Infec Dis 1999; 5:722-723.

Martin Hausmann. How Bacteria-Induced Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells Contributes toMucosal Inflammation. International Journal of Inflammation 2010; 9:574-568.

Martinez-Martinez, L., Ortega, MC. and Suarez, A.I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. J Clin Microbiol 1995; 33: 1318–1321.

Martins C, Faria L, Souza M, Camello T, Velasco E, Hirata R Jr, Thuler L, Mattos-Guaraldi A Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:905-913.

Marty N, Agueda L, Lapchine L, Clave D, Henry-Ford S, Chabanon G. Adherence and hemagglutination of *Corynebacterium* group D2. Eur. J. Clin Microbiol Infect Dis 1991; 10: 20-24.

Massari P, Ho Y, Wetzler LM. *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cell from apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 9070-9075.

Mattos-Guaraldi AL, Cappeli EA, Previato JO, Formiga LCD, Andrade AFB. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. FEMS Microbiol. Lett. 1998; 170: 159-166.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LC, Andrade AFB. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. Curr Microbiol 1999a; 38:37-42.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Andrade AFB. Trans-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. FEMS Microbiol Lett 1998b; 2: 167-172.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Andrade AFB. Trans-sialidase for sialic acid incorporation on *Corynebacteriium diphtheriae*. FEMS Microbiol Lett 1999b, 168:167-172.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Pereira GA. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. Microbes Infect 2000; 2:1507-12. Menzies BE, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. Infect Immun 1998; 66:5994-5998.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Agglutination of sheep erythrocytes by *Corynebacterium diphtheriae*. Braz J Med Biol Res 1986; 1: 75-77.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. Curr Microbiol 1998; 3: 156-158.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Hemagglutination pattern of *Corynebacterium diphtheriae*. Rev Microbiol 1992; 23: 8-12.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*. Braz J Med Biol Res 1991; 4:399-406.

McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. Toxicol Lett 1998; 99: 157-168.

Mckeown-Longo PJ. Fibronectin cell surface interactions. Rev Infec Dis 1987; 9: 322-334.

Melo AR, Lasunskaia EB, Almeida CMC, Kipnis TL, Dias da Silva W. Expression of the virulence factor, BfpA, by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for apoptosis signalling but not for NF-B activation in host cells. Scan J Immunol 2005; 61: 511.

Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancope-Oliveira R, de Matos Guedes HL, Soares CP. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect 2006; 8: 1550-1559.

Menzies B, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by Endothelial Cells Induces Apoptosis. Infect Immun 1998; 66: 5994–5998.

Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. Crit Rev Oral Biol Med 1997;8: 389-409.

Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Microtubuloles are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun 1999; 12: 6518-6525.

Miller RA, Rompalo A, Coyle MB. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in an immunologically intact host. Diagn Microbiol Infect Dis 1986; 4:165-171.

Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun 2004; 72:3658-3663.

Monack DM, Mecsas J, Ghori N, Falkow S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 10385-10390.

Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 3: 9833-9838.

Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E, Bentzmann S. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. Infect Immun 2002; 70: 620-630.

Moreira LO, Andrade AFB, Vale MD, Mattos-Guaraldi AL. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. Appl Environ Microbiol 2003; 69:5907-5913.

Morimoto H and Bonavida B: Diphtheria toxin and *Pseudomonas* A toxin-mediated apoptosis. J Immunol 149: 2089-2094, 1992.

Morinaga Y, Yanagihara K, Yamada K, Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Inoue Y, Kamihira S, Kohno S. [Two cases of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* respiratory tract infection]. Kansenshogaku Zasshi 2010;84:65-68.

Morinaka S, Kurokawa M, Nukina M, Nakamura H. Unusual *Corynebacterium mucifaciens* isolated from ear and nasal specimens. Otolaryngol Head Neck Surg 2006; 3:392-396.

Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. J Cell Sci 1995;108 :2457-2464.

Morris A, Guild I. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains. Rev Infect Dis 1991; 13:887-892.

Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb Haemost 2005; 3: 1894–1904.

Moyad TF. Two-stage arthroplasty for the treatment of chronic osteomyelitis after routine arthroscopic knee surgery. Orthopedics 2013;36: 109-112.

Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. Infect Immun 2001; 69: 4572-4579.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11:142-201.

Necchi V, Candusso ME, Tava F, Lunetti O, Ventura U, Fiocca R. Intracellular, intercellular and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplasic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2007; 132: 1009-1023.

Nhan TX, Parienti JJ, Badiou G, Leclercq R, Cattoir V. Microbiological investigation and clinical significance of *Corynebacterium spp*. in respiratory specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2012;74:236-241.

Niemann HH; Schubert WD; Heinz DW. Adhesin and invasin of pathogenic bacteria: a structural view. Microb Infect 2004; 6: 101-112.

Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. Thromb Haemost 2007; 98: 488-496.

Nyberg P, Sakai T, Cho K, Caparon M, Fassler R, Bjorck L. Interactions with fibronectin attenuate the virulence of *Streptococcus pyogenes*. Embo J 2004; 23: 2166-2174.

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

O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 1998; 30: 295–304.

O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penadés J, Litt D, Fitzgerald DJ, Foster TJ, Cox D. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. Mol Microbiol 2002; 44: 1033-1044.

Oelschlaeger TA, Guerry P, Kopecko J. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechenisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 6884-6888.

Ofek I, Doyle R. Bacterial adhesion to cell and tissues. Chapman & Hall 1994; 94-136; 321-511.

Öhman L, Willen R, Hultgren OH, Hultgren Hornquist E. Acellular *Bordetella pertussis* vaccine enhances mucosal interleukin-10 production, induces apoptosis of activated Th1 cells and attenuates colitis in Galphai2-deficient mice. Clin Exp Immunol 2005; 141: 37-46.

Ojcius DM, Souque P, Perfettini J-L, Dautry-Varsat A. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia*. J Immunol 1998; 161: 4220-4226.

Olender A, Niemcewicz M. Macrolide, lincosamide, and streptogramin B-constitutive-type resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from upper respiratory tract specimens. Microb Drug Resist 2010; 16:119-122.

Oliveira R, Azeredo J, Teixeira P. The importance of physicochemical properties in biofilm formation and activity. In: Wuertz S, Bishop PL, Wilderer PA, eds. Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach, London: IWA Publishing 2003; 211-231.

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.

O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. J Bacteriol 2008; 190: 3835-8350.

Palma M, Shannon O, Quezada HC, Berg A, Flock JI. Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. J Biol Chem 2001; 276: 31691–31697.

Pankov R & Yamada KM. Fibronectin at a glance. J Cell Sci 2002; 15: 3861-3863.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Riley PF, Reynolds EC. Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol 2006152: 2381-2394.

Pavan ME, Robles C, Cairó FM, Marcellino R, Pettinari MJ. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase b-subunit gene (rpoB) Research in Veterinary Science 2012; 2:202–206.

Pereira ACM, Britto-Filho JD, Carvalho JJ, Luna MG, Rosa ACP. *Escherichia coli* enteroaggregative (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. Microb Pathog 2008; 45: 310-314.

Perkins S, Walsh E, Deivanayagam C, Narayana S, Foster T, Höök M. Structural organization of the fibrinogen-binding region of the clumping factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 2001; 276: 44721–44728.

Piroth L, Que YA, Widmer E, Panchaud A, Piu S, Entenza JM, Moreillon P.The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis. Infect Immun 2008; 76: 3824-3831.

Potera, C. Forging a link between biofilms and disease. Science 1999; 283: 1837–1838.

Que YA, Francois P, Haefliger JA, Entenza J-M, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. Infect Immun 2001; 69: 6296–6302.

Que YA, Haefliger JA, Piroth L, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. The J Exp Med 2005; 201: 1627–1635

Rajan S, Cacalano G, Bryan R, Ratner AJ, Sontich CU, van Heerckeren A. *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors. Am J Resp Cell Mol Biol 2000; 23: 304-312.

Ramos Rincon JM, Ramirez AC, Alemany Frances ML. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a new respiratory pathogen? Presentation of one case of acute suppurative tracheobronchitis. Enferm Infecc Microbiol Clin 1998; 16:44-45.

Resch A, Leicht S, Saric M, Pasztor L, Jakob A, Gotz F, Nordheim A. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. Proteomics 2006; 6:1867-1877.

Reyn A, Birch-Andersen A, Lapage SP. An electron microscope study of thin sections of *Haemophilus vaginalis* (Gardner and Dukes) and some possibly related species. Canadian J Microbiol 1966; 12: 1125-1140.

Reynolds HY. Respiratory infections: community-acquired pneumonia and newer microbes. Lung 1996; 174:207-224.

Riegel P, Heller R, Prevost G, Jehl F Monteil H. *Corynebacterium durum* sp. nov., from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1997; 4:1107-1111.

Riegel P, Liegeois P, Chenard MP, Mathelin C, Monteil H. Isolations of *Corynebacterium kroppenstedtii* from a breast abscess. Int J Med Microbiol 2004; 6:413-416.

Riegel P, Ruimy R, Christen R, Monteil H. Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15:657-662.

Riegel P, Ruimy R, De Briel D, Prevost G, Jehl F, Bimet F, Christen R, Monteil H. *Corynebacterium argentoratense* sp. nov., from the human throat. Int J Syst Bacteriol 1995; 3:533-537.

Riegel P. Bacteriological and clinical aspects of *Corynebacterium*. Ann Biol Clin 1998; 56: 285-296.

Riise GC, Qvarfordt I, Larsson S, Eliasson V, Andersson BA. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. Respiration 2000; 67: 552-558.

Rikitomi N, Akiyama M, Matsumoto K. Role of normal microflora in the throat in inhibition of adherence of pathogenic bacteria to host cells: in vitro competitive adherence between *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* and *Branhamella catarrhalis*. Kansenshogaku Zasshi 1989; 1963:118-124.

Rikitomi N, Nagatake T, Matsumoto K, Watanabe K, Mbaki N. Lower respiratory tract infections due to non-diphtheria corynebacteria in 8 patients with underlying lung diseases. Tohoku J Exp Med 1987; 153:313-325.

Rivera J, Vannakambadi G, Höök M, Speziale P. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. Thromb Haemost 2007; 98: 503–511.

Rivero M, Quereda C, Martin-Davila P, Moya JL, Navas E, Moreno S. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21:117-119.

Roig P, Lopez MM, Arriero JM, Cuadrado JM, Martin C. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* pneumonia in a patient diagnosed with HIV infection. An Med Interna 1993; 10:499-500.

Romero-Steiner S, Vitek T, Balish E. Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. J Clin Microbiol 1990; 28: 27-31.

Rosenau A, Martins K, Amor S, Gannier F, Lanotte P, Van Der Mee-Marquet N, et al. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the fbsA and fbsB genes. Infect Immun 2007; 75: 1310–1317.

Rosenberg M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. Appl Environm Microbiol 1981; 42:375-377.

Rosenshine I, Ruschkowski S, Finlay BB. Inhibitors of cytoskeletal function and signal transduction to study bacterial invasion. Methods Enzymol 1994; 236: 467-476.

Rosenshine I. Species specificity and tissue tropism of EPEC and related pathogens. Trends Microbiol 1998; 10:388.

Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. Haematologica 2003; 88: 212-218.

Russo TA, Davidson BA, Genagon SA, Warholic NM, Macdonald U, Pawlicki PD, et al. *E. coli* virulence factor hemolysisn induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 289: 207-216.

Sabbadini PS, Genovez MRN, da Silva CF, Adelino TLM, dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Dias AA, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Jr R. Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010;105:706-711.

Sabbadini PS, Assis MC, Trost E, Gomes DL, Moreira LO, dos Santos CS, Pereira GA, Nagao PE, Azevedo VA, Hirata Júnior R, dos Santos AL, Tauch A,Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. Microb Pathog 2012; 52: 165-176.

Sahingur SE, Boehm TK, Sojar HT, Sharma A, de Nardin E. Fibrinogen-Neutrophil interactions in response to fMLP and *Porphyromonas gingivalis* fimbrial peptides. Immunol Invest. 2006; 35: 63-74.

Santos CS, dos Santos LS, de Souza MC, dos Santos Dourado F, de Souza de Oliveira Dias AA, Sabbadini PS, Pereira GA, Cabral MC, Hirata Junior R, de Mattos-Guaraldi AL. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. Microbiol Immunol 2010;54:1-10.

Sauer K & Camper AK. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas* putida in response to surface associated growth. J Bacteriol 2001; 183: 6579–6589.

Savill J, Fadok V. Corpse clearence defines the meaning of cell death. Nature 2000; 407: 784-788.

Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. Infect Immun 2004; 72: 6197–6205.

Schwarz-Linek U, Höök M, Potts JR. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. Mol Microbiol 2004; 52: 631-641.

Schwarz-Linek, U, Werner, JM, Pickford, AR, Gurusiddappa, S, Kim, JH, Pilka, ES, Briggs, JAG, Gough, TS, HoÈoÈk, M, Campbell, ID, Potts, JR.. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem β-zipper. Nature 2003; 423: 177-180.

Sillanpää J, Nallapareddy SR, Houston J, Ganesh VK, Bourgogne A, Singh KV, Murray BE, Höök M. A family of fibrinogen-binding MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. Microbiology 2009; 155: 2390-2400.

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

Söderquist B, Alriksson I, Källman J, Kihlström E. The influence of adhesive and invasive properties of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins on secretion of interleukin-6 by human endothelial cells. APMIS 2006; 114: 112-116.

Soriano F, Fernández-Roblas R, Calvo R, García-Calvo G. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative non-spore-forming gram-positive bacilli to HMR 3647 (RU 66647) and 14 other antimicrobials.. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1028-1033.

Sousa C, Botelho C, Oliveira R. Nanotechnology applied to medical biofilms control. In Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.) 2011. pp 878-888.

Souza SMS. Interação de amostras do biotipo fermentador e não fermentador de sacarose de *Corynebacterium diphtheriae* com fibronectina de plasma humano. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2000.

Souza, SMS, Nagao, PE, Bernardo-Filho, M, Pereira, GA, Napoleão, F, Andrade, AFB, Hirata JrR., Mattos-Guaraldi, AL.Technetium-99m labeling and fibronectin binding ability of *Corynebacterium diphtheriae*. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica 2004; 20: 35-40.

Stanley NR, Lazazzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Mol Microbiol 2004; 52:917-924.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001; 358:135-138.

Stoodley, P, Sauer, K, Davies, DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol 2002; 56: 187–209.

Sun H. The interaction between pathogens and the host coagulation system. Physiology 2006; 21: 281-288.

Suzuki T, Lihara H, Uno T, Hara Y, Ohkusu K, Hata H, Shudo M, Ohashi Y. Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. J Clin Microbiol 2007; 45: 3833–3836.

Szmygin-Milanowska K, Kieszko R, Chudnicka A, Milanowski J. Microbial etiologies in community acquired pneumonia (CAP). Ann. Univ Mariae. Curie Sklodowska [Med.] 2003; 58:466-474.

Taguchi M, Nishikawa S, Matsuoka H, Narita R, Abe S, Fukuda K, Miyamoto H, Taniguchi H, Otsuki M. Pancreatic abscess caused by *Corynebacterium coyleae* mimicking malignant neoplasm. Pancreas 2006; 4:425-429.

Takai S, Yanagawa R, Kitamura Y. pH - Dependent adhesion of piliated *Corynebacterium renale* to bovine bladder epithelial cells. Infect Immun 1980; 28: 669-674.

Takeuchi M, Yokota A. Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol 1989; 35: 233-252.

Tan E, Low KW, Wong WSF, Leung Y. Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with tyrosine kinase inhibitor. Microbiology 1998; 144: 299-307.

Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schroten H. Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun 2005; 73: 4404-4409.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. Science 1998; 281: 1312-1416.

Tiralongo J, Wohlschlager T, Tiralongo E, Kiefel MJ. Inhibition of *Aspergillus fumigatus* conidia binding to extracellular matrix proteins by sialic acids: a pH effect? Microbiol 2009; 155: 3100-3109.

Vale MD. Interação com células epiteliais linhagem HEp-2 de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* isoladas de pacientes com quadros de pneumonia fatal. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2003.Mestrado]. Rio de Janeiro, RJ. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2003.

Van den Velde S, Lagrou K, Desmet K, Wausters G. Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 2: 99-104.

Vercellotti G, Lussenhop D, Peterson P, Furcht L, Mc Carthy JB, Jacob HS & Moldou CF. Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: a possible mechanism for bacterial tissue tropism. J Lab Clin Med 1984; 103: 34-43.

Vergara-Irigaray M, Valle J, Merino N, Latasa C, García B, de los Mozos I, Solano C, Toledo-Arana A, Penadés Jr, Lasa I. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. Infect Immun 2009; 77: 3978–3991.

Viudes A, Perea S, Lopez-Ribot JL. Identification of continuous B-cell epitopes on the protein moiety of the 58-kilodalton cell wall mannoprotein of *Candida albicans* belonging to a family of immunodominant fungal antigens. Infect Immun 2001; 69: 2909–2919.

Voiriot P, Charlin B, Marcoux JA, Guirgis H. Subacute rhinosinusitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. CMAJ 1986; 134:1034-1035.

von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infec Dis 2002; 2:677-685.

von Graevenitz A, Punter-Streit V, Riegel P, Funke G. Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals. J Clin Microbiol 1998; 36:2087-2088.

Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules 2009; 14: 2535-2554.

Walker TS. Rickettsial interactions with human endothelial cells in vitro: adherence and entry. Infect Immun 1984; 44: 205-210.

Walsh EJ, O'Brien LM, Liang X, Hook M, Foster TJ. Clumping factor b, a fibrinogen-binding MSCRAMM adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin10. J Biol Chem 2004; 279: 50691-50699.

Wang CC, Mattson D, Wald A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. Bone Marrow Transplant 2001; 27: 445–449.

Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M, Kjelleberg S. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J Bacteriol 2003; 185: 4585–4592.

Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol 1999; 53: 155-187.

Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Ann Rev Microbiol 1996; 50: 513-552.

Williams EA, Green JD, Salazar S, Berk SL. Pneumonia caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. J Tenn Med Assoc 1991; 84:223-224.

Wilson ME, Shapiro DS. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Clin Infect Dis 1992; 15:1059-1060.

Wright ED, Richards AJ, Edge AJ. Discitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* following ear, nose and throat surgery. Br J Rheumatol 1995; 34:585-586.

Yanagawa R, Honda E. Presence of pili species of human and animals parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. Infect Immun 1976; 13: 1293-1295.

Yoshida S, Katayama E, Kuwae A, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C. *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac 1 activity and efficient bacterial internalization. EMBO J 2002; 21: 2923-2935.

Yoshitomi Y, Higashiyama Y, Matsuda H, Mitsutake K, Miyazaki Y, Maesaki S, Yamada H, Hori H, Koga H, Kohno S. Four cases of respiratory tract infections caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Kansenshogaku Zasshi 1992; 66:87-92.

Yrlid U, Wick MJ. *Salmonella*-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. J Exp Med 2000; 191: 613-623.

Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med 2004; 351: 1645-1654.

Zimmermann O, Sproer C, Kroppenstedt RM, Fuchs E, Kochel HG. *Corynebacterium thomssenii* sp. nov., a *Corynebacterium* with N-acetyl-beta-glucosaminidase activity from human clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1998; (2):489-494.

Zychlinsky A, Sansonetti P. Apoptosis in bacterial pathogenesis. J Clin Invest 1998; 167:179–184.

ANEXO - Produção Científica Durante o Período de Realização do Doutorado

Linhas de Pesquisa

1 Diretório de Grupo de Pesquisa no Brasil - Linha de Pesquisa: Envelhecimento e fragilidade em uma coorte de idosos na cidade do RJ: associação entre o fenótipo clínico, processos infecciosos e biomarcadores de competência imunológica.

2 Doenças infecciosas comunitárias nosocomiais

Artigos Completos Publicados em Periódicos

1. Baio PVP, Franceschi HM, Freitas AD, Gomes DLR, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TCF, Hirata RJr, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online). , v.108, p.23 - 29, 2013.

2. Souza MC, Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Nagao PE, Santos CS, Hirata RJr, Sabbadini PS, Gomes DLR, Rosa ACP, Santos LS, Asad LMBO. Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso). , v.107, p.486 - 493, 2012.

3. Peixoto RS, Siqueira GCO, Luca FM, Sant'Anna LO, Santos LS, Gomes DLR, Souza MC, Sabbadin PS, Hirata RJr, Martins CAS, Mattos-Guaraldi AL. Aspectos fenotípicos e do potencial patogênico de amostra de *Corynebacterium diphtheriae* isolada de processo de osteomielite em paciente com neoplasia. Revista Brasileira de Analises Clinicas. , v.43, p.230 - 236, 2011.

4. Santos CS, Santos LS, Souza MC, Dourado FS, de Souza AAOD, Sabbadini PS, Pereira GA, Cabral MC, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. **N**on-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. Microbiology and Immunology. , v.54, p.1 - 10, 2010.

5. Dias AASO, Silva Junior FC, Pereira GA, Souza MC, Camello TCF, Damasceno JALD, Pacheco LGC, Miyoshi AAVA, Hirata RJr, Boas MHSV, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the Metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.). , v.10, p.743 - 748, 2010.

6. Alves JR, Pereira ACM, Souza MC, Costa SB, Pinto AS, Mattos-Guaraldi AL, Hirata JR, Rosa ACP, Asad LMBO. Iron-limited condition modulates biofilm formation and interaction with human epithelial cells of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). Journal of Applied Microbiology (Print). , v.108, p.246 - 255, 2010.

7. Camello TCF, Souza MC, Damasco PV, Marques EA, Pimenta FP, Pereira GA, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a humam pathogen overlooked in emerging countries. Letters in Applied Microbiology. , v.48, p.458 - 464, 2009.

8. Gomes DLR, Martins CAS, Faria LMD, Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, Souza MC, Alves GB, Rosa ACP, Nagao PE, Pereira GA, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. Journal of Medical Microbiology 2009; 58: 1419 – 1427.

9. Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Camello TCF, Velasco E, Hirata RJr, Thuler LCS, Mattos-Guaraldi AL. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five year study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso). , v.104, p.905 - 913, 2009.

10. Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata RJr, Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. Letters in Applied Microbiology. , v.46, p.307 - 311, 2008.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

1. Souza C, Souza MC, Mota HF, Ramos JN, Louredo LS, Martins MS, Souza LP, Faria YV, Sant'Anna LO, Santos LS, Gomes DLR, Santos CS, Bello AR, Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL. Avaliação da formação de biofilme por amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas em surto epidêmico nosocomial In: XXI Congresso Latino-Americano de Microbiologia, 2012, Santos. **Anais do XXI Congresso Latino-Americano de Microbiologia**. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2012. v.1. p.80 - 80

2. Franceschi HM, Baio PVP, Souza C, Souza MC, Ramos JN, Souza LP, Faria YV, Sant'Anna LO, Santos CS, Santos LS, Louredo LS, Bello AR, Gomes DLR, Moreira LO, Vieira VV, Hirata RJr, Meira MSM, Mattos-Guaraldi AL. Caracterização de amostras de *Corynebacterium striatum* oriundas de surto epidêmico em ambiente hospitalar, Rio de Janeiro, Brasil In: XIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2012, Santos. **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar**. Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, 2012. v.1. p.1 – 1

3. Santos CS, Souza MC, Santos LS, Gomes DLR, Sabbadin PS, Camello TCF, Asad LMBO, Rosa ACP, Nagao PE, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Identification of virulence attributes of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: an easily neglected human pathogen In: Society for General Microbiology Spring Conference 2012, 2012, Dublin. **SGM Spring Conference 2012 Abstracts**. Dublin: Society for General Microbiology, 2012. p.94 - 95

4. Souza C, Souza MC, Franceschi HM, Louredo LS, Meira MSM, Faria YV, Souza LP, Sant'Anna LO, Andrade AO, Santos LS, Gomes DLR, Santos CS, Bello AR, Duarte RS, Hirata RJr, Moreira LO, Mattos-Guaraldi AL, Ramos JN. Perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes de amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas de surto nosocomial ocorrido no Rio de Janeiro. In: XIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2012, Santos. **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar**. Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, 2012. v.1. p.1 – 1

5. Souza MC, Peixoto RS, Sant'Anna LO, Santos LS, Gomes DLR, Sabbadin PS, Pereira GA, Santos CS, Camello TCF, Hirata RJr, Raphael, Mattos-Guaraldi AL. Aggregative adherent *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strains enter and survive within cultured respiratory epithelial cells In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **26º**

Congresso Brasileiro de Microbiologia - 2011. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. v.1352-2.

6. Peixoto RS, Siqueira GCO, Luca FM, Sant'Anna LO, Santos LS, Gomes DLR, Souza MC, Sabbadin PS, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Aspectos fenotípicos e potencial patogênico de *Corynebacterium diphtheriae* isolado de osteomielite em pacientes com neoplasia In: 38º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 2011, Curitiba. A**nais do 38º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2011. p.1 - 1

7. Gomes DLR, Guimarães JPD, Barbosa EAB, Faria YV, Peixoto RS, Alves J, Souza MC, Santos LS, Sant'Anna LO, Mota HF, Santos CS, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Avaliação da formação de biofilme na presença de fibrinogênio em amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos de endocardite In: 26° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **26° Congresso Brasileiro de Microbiologia**. , 2011. v.1964-1.

8. Gomes DLR, Guimarães JPD, Barbosa EAB, Faria YV, Luca FM, Siqueira GCO, Peixoto RS, Sant'Anna LO, Mota HF, Ramos JN, Santos LS, Souza MC, Santos CS, Nascimento DV, Sabbadin PS, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Correlação entre a forte habilidade de formação de biofilme e o desenvolvimento de endocardite por *Corynebacterium diphtheriae* subspécie gravis In: 26° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia - 2011**. , 2011. v.1964-2.

9. Faria YV, Souza MC, Torres LFC, Sant'Anna LO, Ramos JN, Luca FM, Siqueira GCO, Alves GB, Gomes DLR, Dias AASO, Sabbadin PS, Pereira GA, Santos CS, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Métodos alternativos de triagem e de identificação definitiva de amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de interesse médico-veterinário In: 26° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia - 2011**. , 2011. v.1856-1.

10. Peixoto RS, Sabbadin PS, Santos CS, Gomes DLR, Souza MC, Martins CAS, Sant'Anna LO, Ramos JN, Fernandes C, Mota HF, Faria YV, Luca FM, Siqueira GCO, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Propriedades invasivas de amostra isolada de osteomielite In: 26° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **26º Congresso Brasileiro de**

Microbiologia - 2011. , 2011. v.1352-1.

11. Santos LS, Sabbadin PS, Gomes DLR, Alves GB, Santos CS, Souza MC, Moreira LO, Rosa ACP, Pereira GA, Hirata RJr, Asad LMBO, Mattos-Guaraldi AL. Biological effects of potassium tellurite in *Corynebacterium diphtheriae* strains. In: 15th World Congress on Advances in Oncology / 13th International Symposium on Molecular Medicine, 2010, Loutraki. **International Journal of Molecular Medicine**. Athens: Editoral Academy of International Journal of Molecular Medicine, 2010. v.26. p.S59 - S59

12. Sant'Anna LO, Mota HF, Gomes DLR, Souza MC, Santos LS, Santos CS, Pereira GA, Freitas AD, Mattos-Guaraldi AL. Caso de pneumonia nosocomial fatal em paciente portador da SIDA causada por cepa de *Corynebacterium striatum* produtora de biofilme In: II Congresso de Infectologia do Estado do Rio de Janeiro e I Forum de Enfermagem em Infectologia, 2010, Rio de Janeiro. **Anais do INFECTORIO 2010**. , 2010. v.1. p.1 - 1

13. Martins CAS, Pereira GA, Alves GB, Santos LS, Souza MC, Santos CS, Gomes DLR, Faria LMD, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Molecular and phenotypic characterization of *Corynebacterium diphtheriae* strains at a comprehensive cancer center In: 15th World Congress on Advances in Olncology / 13th International Symposium on Molecular Medicine, 2010, Loutraki. **International Journal of Molecular Medicine**. Athens: Editorial Academy of International Journal of Molecular Medicine, 2010. v.26. p.S59 - S59

14. Mattos-Guaraldi AL, Martins CAS, Camello TCF, Faria LMD, Souza MC, Santos LS, Velasco E, Thuler LCS, Hirata RJr. Corinebactérias isoladas de lesões cutâneas malignas: dois anos de estudos In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia in foco**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. v.09. p.103 - 103

15. Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Santos LS, Torres LFC, Camello TCF, Velasco E, Thuler LCS, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium amycolatum*: infecções crônicas persistentes e aumento da resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia in foco Edição Especial**. Porto de Galinhas: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. v.09. p.103 - 103

16. Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Santos LS, Gomes DLR, Santos CS, Pereira GA, Camello TCF, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* um patógeno negligenciado: elevada incidência de infecções por amostras toxinogênicas em hospital especializado em tratamento de câncer In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia in foco Edição Especial**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. v.09. p.102 - 102

17. Dias AASO, Santos CS, Silva Junior FCS, Pereira GA, Souza MC, Camello TCF, Sabbadin PS, Azevedo VA, Boas MHSV, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Difteria por *Corynebacterium ulcerans*: Infecção zoonótica no Brasil? In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia in Foco**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. v.09. p.99 - 99

18. Gomes DLR, Martins CAS, Faria LMD, Souza MC, Sabbadin PS, Santos LS, Pereira GA, Camello TCF, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Fatores de virulência expressos por amostra de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de infecção de catéter de nefrostomia In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia In foco**. Porto de Galinhas: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. v.9. p.125 - 125

19. Santos LS, Sant'Anna LO, Mota HF, Brito WO, Gomes DLR, Souza MC, Santos CS, Camello TCF, Hirata RJr, Mattos-Guaraldi AL. Métodos Fenotípicos de Triagem para o Diagnóstico Laboratorial de *Corynebacterium diphtheriae* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. **Microbiologia in Foco**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. v.09. p.99 - 99

20. Mattos-Guaraldi AL, Boas MHSV, Dias AASO, Silva Junior FCS, Pereira GA, Souza MC, Camello TCF, Camara CBS, Pacheco LGC, Miyoshi A, Azevedo VA, Hirata RJr. *Corynebacterium ulcerans* infecting humans and dogs in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil In: Second Annual Meeting of DIPNET &Tenth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, 2008, Larnaca, Chipre. **Programme and Abstracts Book**. , 2008. v.01. p.61 - 61

Apresentação de Trabalho

1. Conferencista no I **Simpósio de Microbiologia Médica Humana**, 2010. Mesa Redonda : Micro-organismos Emergentes em Doenças Infecciosas. Avaliação de mecanismos de interação de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* com células epiteliais humanas.

Prêmios e Títulos

Aspectos fenotípicos e potencial patogênico de *Corynebacterium diphtheriae* isolado de osteomielite em pacientes com neoplasia. 38º Congresso Brasileiro em Análises Clínicas, Curitiba-PR, (trabalho vencedor do prêmio de melhor projeto em microbiologia) 2010.