



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Paulo Victor Pereira Baio

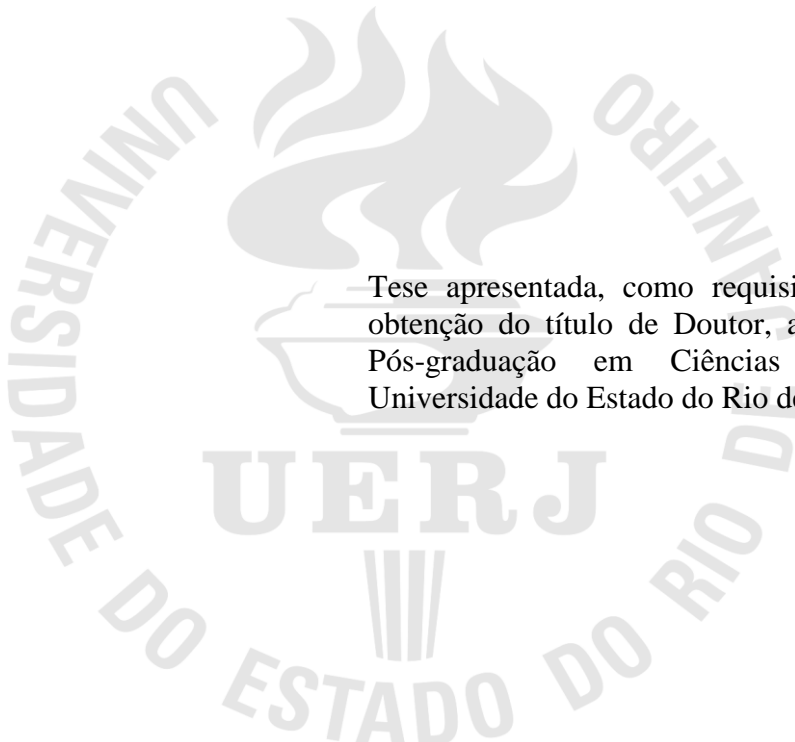
Caracterização molecular de bastonetes Gram positivos irregulares e actinomicetos aeróbios obtidos de espécimes clínicos, de ensaios de esterilidade e de áreas limpas

Rio de Janeiro

2013

Paulo Victor Pereira Baio

Caracterização molecular de bastonetes Gram positivos irregulares e actinomicetos aeróbios obtidos de espécimes clínicos, de ensaios de esterilidade e de áreas limpas



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

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2013

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

B162 Baio, Paulo Victor Pereira.

Caracterização molecular de bastonetes Gram positivos irregulares e actinomicetos aeróbicos obtidos de espécimes clínicos, de ensaios de esterilidade e de áreas limpas / Paulo Victor Pereira Baio. – 2013.
163 f.

Orientadores: Ana Luíza de Mattos Guaraldi.
Verônica Viana Vieira..

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

1. Infecção hospitalar – Teses. 2. Bactérias gram positivas – Teses.
3. Narcodina – Teses. 4. Bacilos Gram Positivos Asporogênicos Irregulares. I. Guaraldi, Ana Luíza de Mattos. II. Vieira, Verônica Viana. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616-022.1

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

Assinatura

Data

Paulo Victor Pereira Baio

Caracterização molecular de bastonetes Gram positivos irregulares e actinomicetos aeróbios obtidos de espécimes clínicos, de ensaios de esterilidade e de áreas limpas

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 28 de maio de 2013

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Verônica Viana Vieira
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª Dra. Paola Cardarelli Leite
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Jose Augusto Adler Pereira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª. Dra. Thereza Cristina Ferreira Camello
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais: Antônio Victor P. Baio (*in memoriam*) e Berenice Paixão Baio.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pela proteção e amor; sou grato por Tua presença constante.

À Professora Dra. Verônica Viana Vieira e à Professora Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi, pela oportunidade da realização deste estudo, orientação, apoio, motivação, ensinamentos e a amizade sincera.

Ao Professor Dr. Raphael Hirata Júnior pela revisão dessa tese.

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

Aos coordenadores e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tendo como atual representante o Professor Dr. Mario Fritsch Toros Neves.

Ao Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS) na pessoa do seu ex Diretor, Dr. André Luis Gemal e a seu atual Diretor Dr. Eduardo Chaves Leal pela oportunidade e todos seus funcionários em particular aos pertencentes ao Departamento de Microbiologia. Aos colegas João, Lúvia, Juliana e Eliza do Laboratório de Identificação Bacteriana pela amizade e companheirismo.

Ao meu pai Antônio Victor Pereira Baio (*in memoriam*) que continua vivo em nossos corações. A minha mãe Berenice Paixão Baio pelo amor, carinho, paciência, dedicação e por todos os esforços para eu chegar até aqui. Aos meus irmãos Geraldo, Fernando e Valéria, meus sobrinhos Thiago, Camilla, Igor, Amanda e Mathews, afilhados, cunhadas, que são muito importantes na minha vida. A todos meus amigos e colegas em especial à Inarah e Wagner pela força.

Ao Coronel Pedro Paulo de Miranda Klein e ao Coronel Haroldo de Oliveira Gomes pela oportunidade e incentivo. Ao Ministério da Defesa e ao Exército pela autorização e liberação para a dedicação exclusiva dada a esse trabalho, ao Cel Barreira, ao ST Souza, ao Capitão Eduardo Pinto e todos os colegas civis e militares do LQFEx pelo apoio. Finalmente, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

A CAPES, CNPq, PRONEX, FAPERJ, PAPES V-FIOCRUZ/CNPq, SR-2/UERJ, PNPD-CAPES/MEC, PAPP-FAPERJ/CAPES pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Muito Obrigado.

Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.

Confúcio

RESUMO

BAIO, Paulo Victor Pereira. *Caracterização molecular de bastonetes Gram positivos irregulares e actinomicetos aeróbios obtidos de espécimes clínicos, de ensaios de esterilidade e de áreas limpas*. 2013. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Os bastonetes Gram positivos irregulares (BGPIs) compõem um grupo de espécies bacterianas com ampla diversidade fenotípica e que podem estar presente no meio ambiente, na microbiota humana e de animais. A identificação acurada de BGPIs em nível de gênero e espécie empregando métodos bioquímicos convencionais é bastante limitada, sendo recomendado, portanto, o uso de técnicas moleculares. No presente estudo, foram identificadas amostras de BGPIs oriundas de espécimes clínicos de humanos, de produtos farmacêuticos e de áreas limpas através da análise de sequências do gene 16S rRNA e de outros genes conservados (housekeeping genes). Os resultados obtidos pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB* demonstraram *C. striatum* multi-resistente (MDR) como responsável por surto epidêmico em ambiente hospitalar da cidade do Rio de Janeiro. Quinze cepas de *C. striatum* foram isoladas em cultura pura a partir de secreção traqueal de pacientes adultos submetidos a procedimentos de intubação endotraqueal. A análise por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) indicou a presença de quatro perfis moleculares, incluindo dois clones relacionados com cepas MDR (PFGE I e II). Os dados demonstram a predominância de PFGE I entre cepas MDR isoladas de unidades de terapia intensiva e enfermarias cirúrgicas. Uma potencial ligação causal entre a morte e a infecção por *C. striatum* MDR (PFGE tipos I e II) foi observada em cinco casos. Adicionalmente, acreditamos que este seja o primeiro estudo de identificação de espécies de *Nocardia* relacionadas com infecções humanas pela análise da sequência multilocus (MLSA) no Brasil. Diferente dos dados observados na literatura (1970 a 2013) e obtidos pelos testes fenotípicos convencionais, a caracterização molecular de quatro loci (*gyrB*-16S-*secA1*-*hsp65*) permitiu a identificação das espécies *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica* e *N. exalbida/gamkensis* relacionadas com quadros de nocardiose em humanos. Cepas de *N. nova* isoladas de diferentes materiais clínicos de um único paciente apresentaram padrões de susceptibilidade antimicrobianos idênticos e dois perfis PFGE, indicando a possibilidade de quadros de co-infecção por *N. nova* em humanos. Em outra etapa da investigação, amostras de BGPIs obtidos de ambientes de salas limpas que não puderam ser identificadas por critérios convencionais foram submetidas a análise da sequência do gene 16S rRNA e caracterizadas 95,83% em nível de gênero e 35,42% em espécies. Para gêneros mais encontrados no estudo, foram analisados os genes *rpoB* e *recA* de dezessete cepas de *Microbacterium* e utilizado o MLSA para a identificação de sete cepas identificadas como *Streptomyces*. Os ensaios permitiram a identificação de três cepas de *Microbacterium* e de uma única amostra de *Streptomyces* ao nível de espécie. A análise da sequência do gene *rpoB* também se mostrou eficaz na identificação de espécies de cepas de *Corynebacterium*. Finalmente, para as cepas ambientais pertencentes à classe Actinobacteria os dados morfológicos, bioquímicos e genotípicos permitiram documentar a cepa 3117BRRJ como representante de uma nova espécie do gênero *Nocardioides*, para o qual o nome *Nocardioides brasiliensis* sp. nov. e as cepas 3712BRRJ e 3371BRRJ como representante de um novo gênero e espécie para o qual o nome *Guaraldella brasiliensis* nov. foi proposto.

Palavras-chave: Bastonetes Gram positivos irregulares. 16S rRNA. Genes housekeeping.

ABSTRACT

Irregular Gram positive rods (coryneform bacteria; IGPRs) comprise a group of species that has a wide phenotypic diversity and makes the conventional identification limited and that may be present in the environment, humans and animals hosts. In order to provide further accurate identification of these microorganisms in a genus and species terms it is recommended the use of molecular methods. In this study, we analyzed the 16S rRNA gene sequences and other conserved genes (housekeeping) in order to elucidate the identification of clinical isolates, pharmaceutical and clean room areas. We have documented a nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant (MDR) *C. striatum* in Rio de Janeiro. *C. striatum* identification was confirmed by 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing. *C. striatum* was mostly isolated in pure culture from tracheal aspirates of adults undergoing endotracheal intubation procedures. The analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) indicated the presence of four PFGE profiles, including two related clones of MDR strains (PFGE I and II). The data demonstrated the predominance of PFGE I, mostly isolated from patients of intensive care units and surgical wards. A potential causal link between death and MDR *C. striatum* (PFGE I and II) infection was observed in five cases. We also performed the identification of *Nocardia* species of human infections by multilocus sequence analysis (MLSA) and characterized their antimicrobial and phenotypic profiles. An overview from 1970 to 2013 of the case reports on *Nocardia* species related to human infections, except mycetomas, in Brazil, was also accomplished. Molecular characterization by four-locus (*gyrB*-16S-*secA1*-*hsp65*) has provided the species identification *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica* and *N. exalbida/gamkensis*. *N. nova* strains isolated from different clinical specimens of one patient showed identical antimicrobial susceptibility patterns. PFGE analysis performed to determine the genetic relatedness of these *N. nova* strains two distinct profiles, which were designated A and B. This is the first report on identification of *Nocardia* species by MLSA in Brazil. The IGPRs obtained in clean room environments that could not be identified by conventional criteria were studied by 16S rRNA gene sequence analysis that allowed the identification of 95.83% at genus level and of 35.42% at the species level. The most common genus found in the clean room environments were *Microbacterium* and *Streptomyces*. The analysis of *rpoB* and *recA* genes sequence of seventeen *Microbacterium* strains contributed to the identification of three strains at species level. MLSA of seven *Streptomyces* strains identified a single sample at the species level. Moreover, the *rpoB* gene sequence analysis was effective in identifying *Corynebacterium* strains at species level. A new genus and species were found among clean room environmental strains belonging to the Actinobacteria class. Based on the morphological, genotypic and biochemical data presented in this study the 3117BRRJ strain represent a novel specie of the genus *Nocardioides*, for which the name *Nocardioides brasiliensis* sp. nov. was proposed and the 3712BRRJ and 3371BRRJ represent a new genus and species for which the name *Guaraldella brasiliensis* nov. were proposed.

Keywords: Irregular Gram positive rods. Coryneform bacteria. 16S rRNA. Housekeeping genes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ATCC - Coleção de Cultura de cepas tipo Americana

BAL - Lavado Broncoalveolar

BGPI - Bastonete Gram-positivo Irregular

DNA – Ácido desoxiribonucleico

CLSI- Comitê Nacional de padronização para Laboratórios Clínicos

CMI - Concentração Mínima Inibitória

dATP – deoxiadenosinucleosídeo trifosfato

dCTP – deoxicitosinucleosídeo trifosfato

dGTP – deoxiguaninucleosídeo trifosfato

dTTP – deoxitimina trifosfato

dNTP – deoxinucleosídeo trifosfato

DDH – Hibridização DNA-DNA

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

HIV – Vírus da imunodeficiência Humana

IGPR – Bastonetes Gram positivos irregulares

Kb – kilobase

MR- Multiresistente

mA – Mili ampére

MDR – Multi Resistente a Drogas

Ng - Nanograma

Pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial de hidrogênio

rpm – Rotações por minuto

TAE – Tris acetato edta

TE – Tris EDTA

Tris – Hidroximetil Amino Metano

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

V - Volume

(-) – Negativo

(+) - Positivo

(D) – Duvidoso

(F) - Fraco

(T) – Tipo

U - Unidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	JUSTIFICATIVA	28
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	RESULTADOS	30
3.1	Artigo científico – Clonal multidrug-resistant <i>Corynebacterium striatum</i> within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil	30
3.2	Artigo científico – Identification of <i>Nocardia</i> species by Multilocus Sequence Analysis and an overview of Human Nocardiosis in Brazil	38
3.3	Artigo científico – Irregular Gram positive rods and aerobic actinomycetes isolated from clean room environments	71
3.4	Artigo científico – <i>Guaraldella brasiliensis</i> sp. nov. and <i>Nocardioides brasiliensis</i> sp. nov., isolated from clean room environments	107
4	DISCUSSÃO	122
5	CONCLUSÕES	135
	REFERÊNCIAS	137
	APÊNDICE A - Trabalho publicado na Journal of Clinical Microbiology (2011)	154
	APÊNDICE B - Termo de aceite de artigo científico na Journal of Dairy Science (2013)	158
	ANEXO A - Certificado de participação no 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia	160
	ANEXO B - Certificado de participação no 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia	161
	ANEXO C - Certificado de participação no 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia	162
	ANEXO D - Certificado de participação no XII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar	163

INTRODUÇÃO

Taxonomia bacteriana

A taxonomia é uma disciplina da Biologia que requer a observação de um conjunto de características de uma espécie bacteriana dada por sua morfologia, bioquímica, fisiologia, coloração, crescimento, genética, patogenicidade, motilidade, relacionamento filogenético entre outras particularidades. Através desses dados, os microbiologistas classificam os micro-organismos para facilitar sua identificação, nomeando-os com regras internacionais rígidas (International Code of Nomenclature of Bacteria; Bergey, 1986; Gevers et al, 2006).

A taxonomia bacteriana e sua classificação foram baseadas em marcadores fenotípicos até o final do século XIX e na década de 60 foi introduzida a distinção de procariotos e eucariotos. A identificação fenotípica melhorou com a taxonomia numérica, mas forneceu poucas informações sobre as relações filogenéticas dos procariontes. Uma classificação mais satisfatória foi conseguida mais tarde com os métodos quimiotaxonômicos e genotípicos (Schleifer, 2009).

A classificação atual de Bactérias e Archaeas seguem uma abordagem polifásica composto de análises fenotípicas, genotípicas e quimiotaxonômicas assim como a informação filogenética. A diferenciação fenotípica se baseia em características morfológicas, químicas e fisiológicas enquanto que a genotípica na análise do material genético do micro-organismo (Colwell, 1970; Schleifer, 2009).

Um grande número de características fenotípicas de muitas cepas foi possível serem comparadas com o desenvolvimento computacional o que proporcionou a determinação do grau de similaridade entre estas pela matriz de dados criada. Isto contribui em paralelo para o surgimento da taxonomia numérica que relacionou as características fenotípicas com informações genéticas (Vandamme et al, 1996).

A taxonomia bacteriana se desenvolveu enormemente com o sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA e com isso houve um grande avanço na classificação dos procariotos e estudos filogenéticos (Woese, 1987; Rosselló-Mora, 2005; Woese et al, 1990).

O conceito de espécie bacteriana se apurou com as metodologias moleculares utilizadas devido a análise do gene 16S rRNA e a reassociação DNA-DNA, que é o padrão ouro para descrição de uma nova espécie na atualidade (Kostantinidis et al, 2006; Goris et al, 2007; Prakash, 2007).

O conjunto de cepas que compartilham similaridade fenotípica e um grau de similaridade maior ou igual a 70% na hibridização DNA-DNA (DDH) e mais de 97% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA define a espécie bacteriana (Wayne et al, 1987; Rosséll-Mora & Amann, 2001; Kostantinidis et al, 2006).

Foi proposta uma definição de espécie bacteriana baseada na divergência adaptativa fundamentada na teoria evolutiva que incorpora os processos de descendência evolutiva adaptações ecológicas e recombinação homóloga (Vos, 2010).

Outro conceito de espécie foi proposto baseado na teoria filogenética (filogenômica) onde a evolução dos micro-organismos é compreendida pela análise de genes e proteínas (Staley, 2009).

Eventos de recombinação e transferência horizontal de genes podem gerar no futuro um novo conceito de espécie, mas o efeito de fluxo gênico não está bem estabelecido e ainda não são suficientes para a classificação e identificação das bactérias (Schleifer, 2009).

Caracterização dos procariotos

A classificação, caracterização e nomenclatura são a base da taxonomia e esses elementos são campos dinâmicos e interdependentes, pois a classificação vai depender de como o micro-organismo foi caracterizado determinando sua classificação e posterior nomenclatura. O Código Bacteriológico regulamenta a nomenclatura, mas a caracterização e classificação dos procariontes sofreram ultimamente significativas mudanças por não serem formalmente regulamentados (Tindall et al, 2010).

Os procariotos são caracterizados pela taxonomia polifásica que é fundamentada na abordagem fenotípica que inclui características morfológicas, fisiológicas e químicas enquanto que a genotípica fundamenta-se na análise do material genético do micro-organismo (Schleifer, 2009).

Taxonomia dos BGPIs

Os bastonetes Gram-positivos irregulares não esporulados (BGPI) compreende um grupo diverso de bactérias e os gêneros encontrados no presente estudo estão distribuídos em dois diferentes Filos e nas Ordens *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales* e *Bacilales*. Eles se encontram distribuídos nas seguintes Famílias: *Streptomycetaceae*, *Actinomycetaceae*, *Nocardioideaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Gordoniaceae*,

Bacillaceae, *Cellulomonadaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Dermabacteriaceae*, *Sanguibacteraceae* e *Microcaceae* (Euzéby, 2013).

Bastonetes Gram positivos irregulares (BGPI - Bactérias corineformes e nocardioformes).

Dentre os bastonetes Gram positivos irregulares, alguns gêneros bacterianos são denominados informalmente como bactérias corineformes, outros como nocardioformes. Estes termos são imprecisos e utilizados por simples conveniência (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011). Bactérias corineformes são consideradas aquelas que possuem crescimento aeróbico, não esporuladas, não ácido resistente parcial, irregulares, bastonetes Gram positivos (Funke & Bernard, 2011). Bactérias nocardioformes se apresentam como Gram positivas, aeróbicas, usualmente filamentosas e ramificadas produzindo micélios similares aos dos fungos, mas sofrem ruptura ou fragmentação originando formas bacilares e cadeias cocóides curtas (Koneman et al, 2008; Conville & Witebsky, 2011). Dentre os gêneros bacterianos considerados corineformes estão: *Corynebacterium*, *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Helcobacillus*, *Agromyces*, *Curtobacterium*, *Cellulomonas*, *Lefsonia*, *Microbacterium*, *Exiguobacterim* entre outros e os nocardioformes: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Gordonia*, *Actinomadura* entre outros.

As bactérias corineformes e nocardioformes têm origem ambiental ou estão presentes na microbiota humana e de alguns animais (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011; Conville & Witebsky, 2011). Algumas espécies destes grupos são patógenos clássicos para o homem como *Corynebacterium diphtheriae* agente da difteria, *Nocardia brasiliensis* agente de infecções subcutâneas e micetomas e para animais, *Rhodococcus equi* que causa doença pulmonar em potros. As bactérias corineformes e nocardioformes eram consideradas frequentemente apenas como contaminantes de espécimes clínicos por constituir parte da microbiota da pele e da orofaringe humana. Atualmente é indicada uma análise cuidadosa quanto à significância clínica de cepas em uma única cultura de uma das espécies dos grupos bacterianos mencionados enquanto se isolados em múltiplas ocasiões passam a ser clinicamente importantes (Koneman et al, 2008; Reddy et al, 2012).

Atualmente tem aumentado o número de relatos, apontando uma associação de outras espécies de bactérias corineformes e nocardioformes com infecções humanas tais

como: *Exigobacterium*, *Curtobacterium*, *Gordonia terrae*, *Cellulomonas* (Lai et al, 2009; Lai et al, 2010; Funke & Bernard, 2011; Francis et al, 2011).

Importância clínica das bactérias corineformes

Tem emergido extraordinariamente a importância clínica das bactérias corineformes por causarem doenças oportunistas em pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes, pacientes submetidos a procedimentos invasivos e cateterismo vascular e longo período de hospitalização. Quando essas infecções estão relacionadas a espécies multi-resistentes são de difícil tratamento (Funke & Bernard, 2011; Bernard, 2012; Baio et al, 2013).

O *Corynebacterium diphtheriae* continua sendo o patógeno principal das bactérias corineformes embora inúmeras outras espécies desse gênero estejam sendo isoladas frequentemente como agentes oportunistas destacando-se o *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. pseudodiphthericum*, *C. amycolatum* e *C. urealyticum*. Outras bactérias corineformes têm sido descritas de importância clínica como os gêneros *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Brachybacterium*, *Dermabacter*, *Helcobacillus*, *Janibacter*, *Knoellia*, *Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Pseudoclavibacter*, *Arthrobacter*, *Rothia*, *Cellulosimicrobium* e *Exiguobacterium* (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011; Bernard, 2012).

Relatos de otite (Talento et al, 2013), endocardite e osteomielite (Lai et al, 2009), colecistite (Ohtaki et al, 2009), abscesso (Martin et al, 2009), artrite séptica (Francis et al, 2011; Magro-Checa et al, 2011), peritonite (Gardenier et al, 2012), fibrose cística (Sharma et al, 2012), infecção subcutânea (Lemaitre et al, 2011), bacteremia (Shigeta et al, 2013), pneumonia (Cho et al, 2013) e outras doenças foram descritas recentemente por esse grupo de micro-organismos.

Importância clínica das bactérias nocardioformes

As bactérias nocardioformes são classificadas em actinomicetos aeróbios, Gram-positivas e geralmente são filamentosas e ramificadas, com micélio semelhante ao dos fungos que se fragmentam e tomam a forma cocóide ou bastões pequenos. O número de espécies descritas de actinomicetos aeróbios tem aumentado rapidamente e isso tem dificultado o julgamento de seu valor clínico (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011).

O patógeno humano mais comum desse grupo bacteriano pertence ao gênero *Nocardia* que se trata de um bastonete Gram positivo, de aparência muito longa, fina e ramificada

quando observada em esfregaço. Esse micro-organismo também acomete pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes causando problemas pulmonares seguido de infecções no cérebro.

Outros gêneros de actinomicetos aeróbios são frequentemente descritos como patógenos humanos sendo os mais encontrados: o *Dermatophilus*, *Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Norcardiopsis*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Tsukamurella*. *Dermatofilose* (Amor et al, 2011), actinomicetoma (Mohamed et al, 2012), inflamações em usuário de marca-passo (Perkin et al, 2012), peritonite (Gardenier et al, 2012), infecção de pele (Wright et al, 2012), pneumonia (Portocarrero et al, 2012; Godet et al, 2012; Riviere et al, 2012), bacteremia (Karunakaran et al, 2011) entre outras doenças estão sendo descritas para esse grupo bacteriano.

Caracterização bacteriana:

Caracterização fenotípica

A identificação bacteriana geralmente é realizada através de metodologias convencionais que são baseadas nas características fenotípicas tais como: reações metabólicas, características coloniais e morfologia celular em esfregaços corados pelo método de Gram (Koneman et al, 2008). Os sistemas comerciais compactos de identificação foram desenvolvidos a partir da combinação de provas convencionais e enzimáticas com substratos cromogênicos, estes são, por exemplo, API, Enterotube, Minitek, VITEK, BIOLOG entre outros. Nesses sistemas, diferentes conjuntos de substratos miniaturizados são utilizados e proporcionam resultados rápidos e permitem a identificação dos principais grupos bacterianos de importância clínica. Os perfis metabólicos obtidos são comparados com perfis estabelecidos no banco de dados (Biomerieux, 2003; 2013).

Vários estudos realizados em laboratórios clínicos e de pesquisa demonstraram uma correspondência de aproximadamente 95% a 97% das identificações realizadas por sistemas compactos com os sistemas convencionais de identificação de vários grupos de micro-organismos de origem clínica. Sendo assim, os sistemas compactos encontraram uma ampla aceitação nos laboratórios clínicos como um método confiável para identificação rápida (Eigner et al, 2005).

As bactérias corineformes e nocardioformes compõem um grupo de espécies bacterianas que apresenta uma grande diversidade fenotípica que torna a identificação

convencional bastante limitada, sendo recomendada na maioria dos casos, a utilização de metodologias complementares tais como a determinação dos tipos de peptidoglicana, menaquinonas e ácidos graxos da parede celular e técnicas moleculares para fornecer acurada identificação destes micro-organismos em termos de gênero e espécie (Funke et al, 1997; Grove et al, 1999; Tang et al, 2000).

Alguns autores têm destacado a dificuldade da identificação das bactérias corineformes e nocardioformes e a importância desta na associação com infecções humanas e alertam que os métodos usados para a identificação em laboratórios microbiológicos clínicos são ineficientes quando deparam com a diversidade de organismos que necessitam identificar (Coyle & Lipsky, 1990; Funke et al, 1997; Mistry et al, 2006).

Caracterização genotípica

Estudos têm demonstrado identificações equivocadas das bactérias corineformes e nocardioformes e mostram a necessidade de metodologias moleculares para conclusão da identificação (Lau et al, 2002; Woo et al, 2003; Gil-Sande et al, 2006).

Com relação à identificação de bactérias provenientes do controle ambiental e de produtos farmacêuticos, alguns estudos mostram a necessidade de metodologias moleculares para a conclusão da identificação de vários grupos bacterianos, inclusive bastonetes Gram positivos irregulares (Sutton & Cundell, 2004; Cundell, 2006). Cundell (2006) realizou uma revisão sobre estratégias de identificação e caracterização microbiana em produtos farmacêuticos e em programas de monitoramento microbiano e considera necessária a utilização de metodologias moleculares para análise mais efetiva das investigações sobre os contaminantes de produtos e ambientes farmacêuticos, com objetivo de identificar a origem e determinar ações preventivas na indústria.

Vários métodos baseados na tipagem de DNA são conhecidos, as quais fornecem informação para delinear as bactérias em diferentes gêneros e espécies e têm o potencial para resolver as diferenças entre as cepas de uma mesma espécie. Um grande número de estudos sobre a taxonomia e tipagem bacteriana tem utilizado a análise do DNA o que tem contribuído para aumentar nosso conhecimento acerca dos mecanismos básicos da evolução (Gürtler & Mayall, 2001).

A classificação dos micro-organismos utilizando apenas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas não esclarece o seu estado taxonômico, assim com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular onde utilizamos o sequenciamento

completo do gene 16S rRNA, análise filogenética, hibridação DNA-DNA entre outras técnicas, propiciam o melhor posicionamento taxonômico das bactérias (Prakashi et al, 2007).

A determinação do conteúdo guanina-citosina (% mol G-C) do genoma foi a primeira metodologia utilizada para classificar um táxon bacteriano a um nível taxonômico mais elevado e esse índice pode variar de 26 a 76% no genoma dos procariotos sendo importante para a caracterização da natureza genômica. Consideram-se uma diferença superior a 10% nesse índice para se caracterizar gêneros diferentes e um valor inferior a 3% como sendo mesma espécie (Prakash et al, 2007; Schleifer, 2009).

As metodologias envolvendo ácidos nucleicos revolucionaram a identificação e classificação dos micro-organismos. Dentre estas metodologias, a análise da sequência do gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizada para a determinação do relacionamento filogenético das bactérias. A conservação deste gene reflete a importância deste como um componente crítico da célula (Woese, 1987). O gene 16S rRNA possui aproximadamente 1550 pares de bases e é composto de regiões variáveis e conservadas com polimorfismos interespecíficos que proporcionam distinção e medidas estatisticamente válidas. Em geral, a comparação das sequências do gene 16S rRNA permite a diferenciação entre gêneros de organismos (Woese, 1987).

Atualmente, a análise da sequência do gene 16S rRNA tem sido utilizada não apenas para a determinação do relacionamento filogenético bacteriano, mas também tem contribuído para a identificação bacteriana (Bosshard et al, 2003; Drancourt, 2004; Rivas et al, 2004; Mignard & Flandrois, 2006; Petti, 2007). A utilização do gene 16S rRNA para fins de identificação tem sido ampla, uma vez que este gene é universal para bactérias e uma grande quantidade de sequências deste gene está disponível em banco de dados de sequências de nucleotídeos permitindo assim a comparação das sequências de cepas desconhecidas (Clarridge, 2004).

Podemos identificar as cepas bacterianas com base na similaridade da sequência, pela comparação com as sequências depositadas nos bancos de dados: BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP - Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Rajendhran & Gunasekaran 2010).

A utilização de sequências parciais do gene 16S rRNA na identificação de isolados bacterianos de origem clínica tem sido realizada com sucesso (Park et al, 2011; Jeon et al, 2012).

Em grande parte destes estudos é utilizado o sistema MicroSeq 500 (Applied Biosystems) que amplifica e sequênciia dos primeiros 527 pares de base do gene 16S rRNA. Esta região parece fornecer uma porcentagem maior de diferença entre cepas, porque a região mostra ligeiramente mais diversidade (Clarridge, 2004). A análise de sequências parciais do gene 16S rRNA tem sido empregada também para identificação de bactérias corineformes (Tang et al, 2000; Bosshard et al, 2003). Entretanto, há relatos onde os autores mostram a necessidade do sequenciamento completo do gene para distinguir determinados gêneros e espécies (Sacchi et al., 2002 a e b). Para micro-organismos que compartilham identidade completa da sequência do gene 16S rRNA, outros genes alternativos podem fornecer uma melhor separação das espécies estreitamente relacionadas e diferentes espécies podem compartilhar identidade completa do gene 16S rRNA (Satomi et al, 2006; Petti, 2007; Schleifer, 2009).

O operon ribossomal pode possuir múltiplas cópias variando de 1 a 15 e sua heterogeneidade dentro do genoma são consideradas como fator limitante para o uso na identificação de espécies bacterianas. As sequências dessas cópias apresentam-se divergência de 1 a 2% e, portanto são praticamente idênticas (Schleifer, 2009).

Para discriminar as espécies estreitamente relacionadas, podemos usar o sequenciamento dos genes conservados (*housekeeping*) do genoma bacteriano (Petti, 2007, Richert et al, 2007). Esses genes têm sido usados para análise taxonômica e identificação. Os marcadores alternativos devem cumprir alguns critérios tais como: os genes devem ser distribuídos extensamente entre os genomas, os genes devem estar presentes como uma única cópia dentro de um dado genoma, as sequências individuais do gene devem ser longas suficientes para conter informações almejadas, mas curta o bastante para reservar os sequenciamentos dos nucleotídeos de maneira conveniente (900 a 2.250 nucleotídeos) (Zeigler et al, 2003; Thompson et al, 2005).

Dentre os genes que oferecem possibilidades de serem utilizados como alvos universais ou de grande espectro (genes *housekeeping*) que têm sido utilizados para fins taxonômicos e de identificação de várias espécies bacterianas estão: o gene *secA1* que é um componente essencial da enzima translocase (ATPase) que fornece força motriz para a exportação das proteínas através da membrana citoplasmática bacteriana, o gene *atpD* que produz o ATP a partir do ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana, o gene *trpB* que é uma subunidade beta responsável pela síntese de L triptofano a partir do indol e da L-serina, o gene *rpoB* que codifica a subunidade beta da RNA polimerase que executa papel essencial na transcrição do DNA para RNA, O gene *gyrB* codifica a subunidade

β da DNA girase apresentando cópia única no genoma bacteriano e esta característica permite o uso deste na discriminação e identificação de espécies relacionadas, o gene *recA* que codifica a recombinase A que está envolvida na recombinação de sequências complementar do DNA e funciona como um regulador chave na resposta SOS. O gene *hsp60* também conhecido como *groEL* codifica uma proteína de 60 kDa dependente de ATP e altamente conservada sendo uma proteína moduladora (chaperonas) que desempenham um papel central no controle conformacional de outras proteínas associadas ao estresse celular (proteínas de choque térmico -HSP) (Thompson et al, 2004; Drancourt & Raoult, 2005; Nahrstedt et al, 2005; Conville et al, 2006; Petti, 2007; Richert et al, 2007; Guo et al, 2008; Silva, 2008).

O gene *rpoB* tem sido utilizado para a identificação de espécies de diversos gêneros bacterianos nos quais as sequências do gene 16S rRNA não puderam discriminar. É essencial no processo de transcrição em bactérias sendo responsável pela síntese de RNA mensageiro, transportador e ribossomal e possui aproximadamente 3000 pares de bases e consiste em três subunidades α_2 , β e ω sendo a subunidade β codificada pelo gene *rpoB*. Khamis e colaboradores (2004) apontaram uma região hipervariável do gene *rpoB* e mostraram que essa região seria suficiente para a identificação e análises filogenéticas.

O sequenciamento dos genes housekeeping é considerado uma alternativa para auxiliar questões taxonômicas e de identificação. Para fins taxonômicos as sequências devem prever o relacionamento do genoma inteiro com precisão e exatidão aceitáveis que correlacionam bem com os dados do 16S rRNA e com as similaridades do genoma inteiro medidas por hibridização DNA-DNA total uma vez que esta metodologia é padrão para a descrição de uma espécie bacteriana (Drancourt & Raoult, 2005).

A definição de espécie bacteriana tem sido amplamente discutida por taxonomistas (Oren, 2004; Gevers et al., 2005; Staley, 2006), entretanto, para que uma espécie seja descrita, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana do “International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology” (IJSEM) reafirma a necessidade da realização da metodologia de reassociação do DNA-DNA e a determinação da divergência (ΔT_m) e sugere que toda descrição de espécie deve incluir uma sequência de 16S rRNA quase completa (>1300 nucleotídeos, <0,5% de ambiguidade) (Stackebrandt et al, 2002). Estes autores encorajam estudos que possam avaliar a utilização de novas metodologias moleculares tais como a análise das sequências de genes “housekeeping” para delinear espécies. Alguns estudos têm mostrado correlação dos dados obtidos pelo sequenciamento de genes housekeeping com os de reassociação de DNA total (Roux, et al, 2005; Thompson et al, 2005).

A hibridização DNA-DNA (DDH) é a metodologia molecular considerada padrão ouro para definir uma espécie bacteriana e ela se baseia na eficiência de hibridização entre moléculas de DNA (Konstantinidis et al, 2006).

Wayne e colaboradores (1987) propuseram que as espécies bacterianas deveriam ser demarcadas com base em uma combinação de mais de um critério e consideraram uma espécie como uma coleção de cepas caracterizadas por pelo menos um traço fenotípico e de diagnóstico onde um purificado de moléculas de DNA mostraria pelo menos 70% de hibridização cruzada. Esse valor é muito criticado, mas é universalmente aplicável no domínio bacteriano sendo difícil de executar e não aplicável em estudos ambientais (Gevers et al, 2005; Konstantinidis et al, 2006).

Stackebrandt e Ebers (2006) sugeriram um limite de 98,7% de similaridade do gene 16S rRNA para descrever uma nova espécie sem realizar experimentos de hibridização DNA-DNA.

Através de condições controladas, as moléculas de DNA de diferentes organismos podem se reassociar para formar um DNA híbrido uma vez que a similaridade das sequências nucleotídicas favorece tal reassociação permitindo a comparação de misturas entre o DNA homólogo (puro) e híbrido obtendo-se um grau de similaridade entre os genomas. Os parâmetros de diferenças entre a temperatura de fusão (ΔT_m) podem ser utilizados para quantificar o grau de similaridade e reflete a estabilidade térmica da dupla fita de DNA e a taxa relativa de ligação (RBR) que compara a quantidade relativa de DNAs híbridos com o DNA homólogo (Rossello-Mora, 2001).

A ligação de sua fita dupla é mais frágil e assim o DNA híbrido tende a se desnaturar a uma temperatura inferior ao DNA puro. O ΔT_m é a diferença entre o T_m do DNA homólogo com o T_m do DNA híbrido. Os valores de 70% de DDH ou maior ou um ΔT_m menor ou igual a 5°C são utilizados para delinear as espécies (Rossello-Mora & Amann, 2001; Konstantinidis et al, 2006).

Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

A metodologia MLSA se baseia no sequenciamento e análise de 5 a 7 genes conservados conhecidos como “*housekeeping genes*” presentes ao longo do genoma bacteriano e distante um do outro com pelo menos 100 Kb (Maiden et al, 1998). Vários lócus possuem um maior poder discriminatório por representar uma pequena porção do genoma e por isso esta metodologia tem sido empregada para aumentar o poder discriminatório

(Rajendran, Gunasekaran, 2010). Os genes “*Housekeeping*” codificam produtos essenciais para o metabolismo bacteriano e apresentam uma evolução lenta, porém mais rápida do que o gene 16S rRNA (Hanage et al, 2006).

O MLSA é baseado na metodologia de “*Multi Locus Sequence Typing*” (MLST) e os dados de MLSA são utilizados para diferenciar os procariotos a nível intraespecífico onde um número de alelo é atribuído a cada sequência de um gene (Gevers et al, 2005).

Eletroforese em gel de campo pulsado – (PFGE - “Pulsed Field Gel Electrophoresis”).

A PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) é uma técnica empregada para separar grandes fragmentos de DNA que foram clivados com enzimas de restrição e essas moléculas são submetidas a campos elétricos aplicados alternadamente em duas direções (pulsado). Esta técnica é utilizada para a identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários sendo uma poderosa ferramenta para investigações epidemiológicas em estudos de surtos hospitalares e comparações de populações microbianas de locais distintos (Magalhães, 2005).

Análise filogenética

A filogenia envolve o entendimento das relações entre as espécies que resultam da evolução e sua identificação uma vez que as espécies evoluem de um ancestral comum e as espécies próximas compartilham características em comum ao contrário das mais distantes. Para definir a relação histórica ou evolucionária e identificar características similares utilizamos a sistemática filogenética e baseados nessas relações são desenvolvidas árvores filogenéticas que mostram a relação evolucionária e agrupamento de organismos (Konstantinidis, 2006).

Importância dos BGPI no controle da qualidade de medicamentos e insumos farmacêuticos estéreis

As condições mínimas de qualidade para medicamentos, fármacos, drogas vegetais, insumos e produtos para a saúde estão instituídas pela Farmacopeia Brasileira. Os medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária devem atender às normas e especificações estabelecidas na 5ª Edição da Farmacopeia Brasileira. Neste compêndio, está

estabelecido que seja realizado o ensaio de esterilidade para produtos e artigos de saúde considerados estéreis, devendo os mesmos não apresentar micro-organismos e esses não devem apresentar células viáveis ou endósporos de micro-organismos em sua composição (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Durante o processo fabril de produtos destinados à saúde é imprescindível que a indústria siga procedimentos que garantam as Boas Práticas de Fabricação para garantir que estes insumos apresentem segurança quanto à sua esterilidade e para assegurar sua qualidade junto ao consumidor realizando o teste de esterilidade em amostras representativas dos lotes produzidos (Brasil, 2010; Farmacopeia Brasileira, 2010).

O procedimento de esterilização que ocorre no final do processo produtivo tende a assegurar que os produtos fabricados não possuam contaminação microbiana e aqueles produtos que não podem ser submetidos a esse processo de esterilização por suas características físicas e químicas devem ser preparados em condições assépticas para prevenir eventual contaminação (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Abreu e colaboradores (2003) concluíram em seus estudos sobre a incidência de micro-organismos em áreas limpas que as bactérias Gram positivas irregulares (BGPI) foram o terceiro grupo bacteriano mais frequentemente isolado. O Setor de Identificação Bacteriana DM/INCQS também tem observado que estas bactérias são frequentemente isoladas na área onde é realizado o Ensaio de Esterilidade de produtos farmacêuticos (Rocha, 2006; Baio, 2007). Estando presentes na microbiota de áreas limpas e dos operadores estas bactérias tornam-se candidatas a contaminantes de produtos farmacêuticos.

Ensaio de esterilidade em área limpa

Produtos que requerem a característica de esterilidade, tais como medicamentos injetáveis, soros, vacinas entre outros, devem ser submetidos ao Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica que visa verificar a qualidade do processo esterilizante empregado durante a fabricação de produtos estéreis, bem como manipulações assépticas. Segundo as farmacopeias, a condição de esterilidade de um produto deve ser considerada com base no fato de que o mesmo tenha sido processado em condições ótimas e que o resultado de uma amostra representativa e estatisticamente calculada, submetida ao ensaio de esterilidade indique a ausência de micro-organismos viáveis (Brasil, 2010; Farmacopeia Brasileira, 2010; The United States Pharmacopeia, 2012).

As condições de realização do teste de esterilidade devem ser adequadas de forma a evitar contaminação acidental da amostra e é fundamental que seja realizado concomitantemente o controle ambiental da área de trabalho, do ar através da contagem de partículas e controle de superfícies, controle da temperatura, pressão e velocidade e direção do fluxo de ar (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Os meios de cultura utilizados no teste de esterilidade devem ser esterilizados por um processo validado e devem cumprir com as condições de qualidade como a promoção de crescimento. Devem oferecer condições de crescimento para diversos micro-organismos (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Para que o Ensaio de Esterilidade tenha validade, a qualidade do ambiente de execução deve ser controlada e conhecida, a fim de evitar resultados falso-positivos, sendo assim, este ensaio deve ser realizado em fluxo laminar (ISO 5) mantido numa área limpa (ISO 7). (Brasil, 2010; Farmacopeia Brasileira, 2010; The United States Pharmacopeia, 2012).

Área limpa é definida pela “International Organization for Standardization” (ISO) como: “Sala na qual a concentração de partículas no ar é controlada e que é construída e usada de modo a minimizar a introdução, geração, e retenção de partículas dentro desta e nos quais outros parâmetros relevantes como temperatura, umidade e pressão são controlados quando necessários” (ISO 14644-1, 2013). Além dos laboratórios de controle da qualidade, indústrias farmacêuticas e produtos correlatos são as que mais usam áreas limpas uma vez que micro-organismos e sujidades não devem ser injetados ou introduzidos no paciente através de seus produtos (Whyte, 2001).

As principais fontes de contaminação por partículas viáveis (micro-organismos) e não viáveis (poeira) nas áreas limpas são: suprimento de ar não filtrado, áreas sujas adjacentes à área limpa, superfícies, operadores, equipamentos, matéria prima e embalagens. Na construção de áreas limpas devem ser utilizados materiais especiais, uma vez que materiais de construção convencionais desprendem partículas facilmente. O ar introduzido numa área limpa deve ser filtrado (ultrafiltros) e é usado para diluir e remover partículas totais dispersas durante a operação nestas áreas e também para pressurizar a sala certificando a qualidade do fluxo de ar interno (Whyte, 2001). Quando a área limpa está em operação, os operadores são a principal fonte de partículas viáveis (micro-organismos), sendo assim é necessário o uso de roupas e equipamentos que minimizem a dispersão de partículas (Reinmuller & Ljungqvist, 2003).

Além da preocupação em se manter níveis mínimos de partículas é importante também o conhecimento da microbiota do ambiente, pois proporciona a possibilidade de rastreamento

da fonte contaminante e auxilia também na avaliação dos procedimentos de limpeza e sanitização (Pinto, 2002; Sutton & Cundell, 2004; Cundell, 2006).

Interpretação dos resultados no teste de esterilidade

Após a execução do ensaio de esterilidade, os tubos contendo os meios de cultura devem ser incubados por 14 dias e durante o tempo de incubação estes devem ser observados quanto à presença de turvação que indicaria crescimento microbiano. Em caso de não turvação dos mesmos (ausência de crescimento), a amostra testada é considerada satisfatória e havendo crescimento, a mesma deve ser considerada não estéril e, portanto insatisfatória (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Durante a execução do ensaio de esterilidade, podem ocorrer falhas que invalidam o teste como deficiente monitoramento microbiológico, procedimentos de análise inadequados, presença no controle negativo de crescimento microbiano e qualquer erro detectado após identificação do micro-organismo que possa estar relacionado à técnica ou materiais envolvidos na análise (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Se o teste de esterilidade for invalidado, este deverá ser repetido seguindo o mesmo procedimento inicial e se não houver detecção de crescimento microbiano, a amostra deve ser considerada satisfatória e em caso contrário insatisfatório. A farmacopeia Brasileira determina que sejam identificados os micro-organismos que desenvolveram nos meios do teste através de ensaios fenotípicos que segundo este compêndio é eficaz para a identificação (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Quando se quer verificar a clonalidade entre duas cepas de origem comum, a Farmacopeia Brasileira recomenda o uso de técnicas moleculares de identificação, porém este compêndio apesar de citar o princípio do método, procedimento, avaliação e interpretação dos resultados, só encontramos esta técnica para detecção de RNA contaminante da hepatite C vírus ou vírus da hepatite C em misturas de plasma (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Gêneros mais estudados

Dentre as amostras analisadas, as famílias mais encontradas foram *Microbacteriaceae*, *Streptomycetaceae*, *Nocardiaceae* e *Corynebacteriaceae* correspondendo respectivamente aos gêneros *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia* e *Corynebacterium*.

Gênero *Microbacterium*

O gênero *Microbacterium* é conhecido desde os anos 90. Apresentam-se como bacilos pequenos Gram-positivos, irregulares, catalase positiva, móveis ou imóveis. Eles são frequentemente encontrados no meio ambiente (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011).

Takeuchi & Hitano (1998) unificaram os gêneros *Microbacterium* e *Aureobacterium* utilizando metodologia molecular além de se basearem em características fisiológicas e quimiotaxonômicas (Koneman et al, 2008; Euzéby, 2013).

Atualmente existem 81 espécies descritas válidas e apenas uma minoria destas tem sua importância clínica. Relatos de eritrasma, bacteremia e peritonite causada por esses micro-organismos foram descritos recentemente (Koneman et al, 2008; Adames et al, 2010; Enoch et al, 2011; Funke & Bernard, 2011; Yasuma et al, 2011; Sharma et al, 2012; Euzéby, 2013).

Gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* é um actinomiceto aeróbio amplamente distribuído na natureza e frequentemente são isolados de solo e possuem grande importância industrial devido aos produtos que estes sintetizam. São bactérias Gram-positivas, filamentosas e ramificadas, produzindo normalmente micélio como os dos fungos que se fragmentam em formas de pequenos bastões (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011).

Atualmente existe mais de 600 espécies válidas descritas de *Streptomyces* (Euzéby, 2013). Relatos de infecções causados por esses micro-organismos são descritos como causadores de infecções pulmonares, actinomicetoma, peritonite, infecção de couro cabeludo entre outras doenças (Datta et al, 2012; Kirby et al, 2012; Riviere et al, 2012; Pellegrini et al, 2012). Eles causam uma síndrome crônica chamada Micetoma que é uma infecção de pele que acomete o tecido celular subcutâneo podendo atingir músculos e ossos principalmente

podendo causar deformações nas partes afetadas e perda de função (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011; Chander et al, 2013).

Gênero *Nocardia*

O gênero *Nocardia* é o mais importante entre os actinomicetos aeróbios. As nocardias são micro-organismos saprófitas de solo, aeróbios, imóveis; Gram-positivos e levemente álcool-ácido resistentes quando visualizados pelo método de Kinyoun-modificado. Usualmente formam hifas aéreas, algumas vezes visualizadas apenas ao microscópio. As hifas ramificadas quando fragmentadas podem exibir formas cocóides e bacilares (Koneman et al., 2008; Conville & Witebsky, 2011).

Estão descritas 86 espécies válidas de *Nocardia* e ultimamente tem aumentado o número de casos de nocardioses humanas, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos apresentando doença pulmonar, neoplasias, infecções pelo vírus HIV, história prévia de alcoolismo, cirurgia, trauma, transplantes ou uso de corticosteróides (Koneman et al, 2008; Conville & Witebsky, 2011; Euzéby, 2013).

As nocardioses cutâneas são usualmente apresentadas em quatro formas clínicas: micetoma, infecção linfocutânea, infecção cutânea superficial (abscesso ou celulite), e infecção cutânea secundária com doença disseminada frequentemente de caráter crônico e de difícil diagnóstico. O maior número de óbitos ocorre em pacientes apresentando quadros de abscesso cerebral, infecções sistêmicas e pneumonias (Shachor-Meyouhas et al, 2012; Sharma et al, 2012; Cattaneo et al, 2013; Saraya et al, 2013; Jorna & Taylor, 2013; Rkiouak et al, 2013).

As nocardias são transmitidas principalmente por inalação e mais raramente através de inoculação direta na pele. No ambiente hospitalar, parece ocorrer a disseminação bacteriana por vias aéreas e transmissão pessoa a pessoa, inclusive pós-cirúrgica. Dentre as espécies predominantemente isoladas como patógenos humanos podemos destacar: *Nocardia abscessus*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova*, *Nocardia otitidiscaviarium*, *Nocardia paucivorans*, *Nocardia pseudobrasiliensis*, *Nocardia transvalensis*, *Nocardia veterana* e *Nocardia wallacei* (Conville & Witebsky, 2011).

Dado ao crescente número de espécies de actinomicetos aeróbios, a utilização de apenas um número limitado de testes fenotípicos para a obtenção de espécies ou mesmo a

identificação exata ao nível de gênero tornou-se impossível. Quando uma identificação precisa for necessária para um isolado de um paciente, o encaminhamento a um laboratório de referência para testes moleculares é altamente recomendável (Conville & Witebsky, 2011).

Gênero *Corynebacterium*

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Corynebacterium* se apresentam como bacilos Gram-positivos pleomórficos, catalase positiva, imóveis, não esporulados e não são ácido-resistentes sendo descritos classicamente como tenderem a formar arranjos em forma de cerca e “caracteres chineses” na coloração de Gram (Koneman et al., 2008; Funke & Bernard, 2011; Bernard, 2012).

Essas bactérias fazem parte da microbiota normal da pele e das vias respiratórias superiores o que torna difícil de correlacioná-los sendo o agente infeccioso ou um simples contaminante. Com o aumento dos pacientes imunocomprometidos tem surgido como importantes agentes de doenças e o patógeno clássico desse grupo é o *Corynebacterium diphtheriae*, causador da difteria (Koneman et al., 2008; Mattos-Guaraldi et al, 2011; Bernard , 2012).

O gênero *Corynebacterium* consiste em 87 espécies válidas descritas (Euzéby, 2013) e um pouco mais de 50 espécies aparecem ocasionalmente ou raramente causando infecções em humanos (Bernard , 2012).

1 JUSTIFICATIVA

A aplicação das metodologias moleculares para a identificação de bastonetes Gram positivos irregulares (bactérias Corineformes e Nocardioformes) vem sendo citada na literatura científica como ferramenta fundamental para a identificação destes grupos bacterianos tanto de origem clínica como de origem ambiental. Devido ao crescente número de indivíduos imunocomprometidos há um aumento de relatos de infecções causados por espécies bacterianas que eram consideradas apenas como colonizadores de animais ou microbiota ambiental. Há uma grande dificuldade de identificar cepas bacterianas provenientes do ambiente por metodologias convencionais, uma vez que os sistemas de identificação são baseados em características fenotípicas presentes nas cepas de origem clínica que muitas vezes não reflete a diversidade fenotípica das cepas ambientais, sendo necessária à aplicação de análises moleculares para este fim. Deste modo a utilização da análise das sequências do gene 16S rRNA e de outros genes conservados (housekeeping) para caracterizar os BGPIs de origem clínica, de produtos farmacêuticos e de áreas limpas permitirão melhorar a discriminação das espécies deste grupo de bactérias que proporcionarão resultados confiáveis às identificações realizadas pelo Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Médica da Faculdade de Ciências Médicas (UERJ) e pelo Laboratório do Setor de Identificação do Departamento de Microbiologia – INCQS/FIOCRUZ.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral realizar a análise de sequências do gene 16S rRNA de bastonetes Gram positivos irregulares (BGPI) e dos actinomicetos aeróbios de origem clínica e ambiental que não conseguem ser identificados definitivamente em nível de gêneros e ou de espécies por metodologias convencionais; Aplicar a metodologia da análise de sequências de alguns genes conservados (housekeeping) para avaliar estes como marcadores para identificação ou para determinar o relacionamento filogenético de alguns gêneros predominantemente encontrados na amostragem estudada.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as sequências do gene 16S rRNA para determinar os gêneros e se possível espécies de *Corynebacterium* de origem clínica que não puderam ser identificadas por metodologia convencional;
- Analisar as sequências dos genes 16S rRNA, *secA1*, *hsp65* e *gyrB* para amostras de origem clínica caracterizadas como *Nocardia*;
- Determinar os gêneros e, se possível, espécies de BGPI e dos Actinomicetos aeróbios de origem ambiental que não puderam ser identificadas por metodologia convencional utilizando a metodologia da análise de sequências do gene 16S rRNA;
- Analisar o relacionamento filogenético de amostras de *Streptomyces* de origem ambiental e de produtos farmacêuticos empregando a metodologia “Multilocus Sequence Analysis” (MLSA) através da análise de sequências dos genes 16S rRNA, *recA*, *rpoB*, *gyrB*, *atpD* e *trpB*; .
- Determinar o relacionamento filogenético de amostras caracterizadas como *Microbacterium* de origem ambiental e de produtos farmacêuticos pela técnica de análise de sequências dos genes 16S rRNA, *recA* e *rpoB*.

3 RESULTADOS

3.1 Artigo científico - Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil

Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil.

Autores: Baio PVP, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TC, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL.

Revista: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2013; 108: 23-29. (Qualis B1)

RESUMO

Corynebacterium striatum é um micro-organismo potencialmente patogênico, com a capacidade de produzir surtos de infecções nosocomiais. Aqui, nós documentamos um surto nosocomial causada por *C. striatum* multi-resistente (MDR), no Rio de Janeiro, Brasil. A identificação do *C. striatum* foi confirmada pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*. Quinze cepas de *C. striatum* foram isoladas de adultos (metade dos quais 50 anos de idade e mais velhos). *C. striatum* foi mais isolado em cultura pura a partir de secreção traqueal de pacientes submetidos a procedimentos de intubação endotraqueal. A análise por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) indicou a presença de quatro perfis moleculares, incluindo os dois clones relacionados com cepas MDR (PFGE I e II). Os dados demonstram a predominância de PFGE tipo I, compreendendo 11 cepas MDR que foram em sua maioria isoladas de unidades de terapia intensiva e enfermarias cirúrgicas. Uma potencial ligação causal entre a morte e a infecção por *C. striatum* MDR (PFGE tipos I e II) foi observada em cinco casos.

Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil

Paulo Vítor Pereira Baio^{1,4,5}, Higor Franceschi Mota¹, Andréa D'Avila Freitas^{1,2},
Débora Leandro Rama Gomes^{1,6}, Juliana Nunes Ramos^{1,4}, Lincoln Oliveira Sant'Anna¹,
Mônica Cristina Souza¹, Thereza Cristina Ferreira Camello^{1,3}, Raphael Hirata Junior¹,
Verônica Viana Vieira⁴, Ana Luíza Mattos-Guaraldi^{1/+}

¹Laboratório de Difteria e Corineobactérias de Importância Clínica, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia, Faculdade de Ciências Médicas ²Unidade Docente Assistencial de Doenças Infecciosas e Parasitárias ³Laboratório de Bacteriologia, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁴Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁵Laboratório Químico Farmacêutico do Exército, Ministério da Defesa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁶Faculdade de Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corynebacterium striatum is a potentially pathogenic microorganism with the ability to produce outbreaks of nosocomial infections. Here, we document a nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant (MDR) *C. striatum* in Rio de Janeiro, Brazil. *C. striatum* identification was confirmed by 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing. Fifteen *C. striatum* strains were isolated from adults (half of whom were 50 years of age and older). *C. striatum* was mostly isolated in pure culture from tracheal aspirates of patients undergoing endotracheal intubation procedures. The analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) indicated the presence of four PFGE profiles, including two related clones of MDR strains (PFGE I and II). The data demonstrated the predominance of PFGE type I, comprising 11 MDR isolates that were mostly isolated from intensive care units and surgical wards. A potential causal link between death and MDR *C. striatum* (PFGE types I and II) infection was observed in five cases.

Key words: *Corynebacterium striatum* - nosocomial outbreak - PFGE - multidrug-resistant clones

Like several other multidrug-resistant (MDR) non-diphtherial *Corynebacterium* species, *Corynebacterium striatum* has been cited with increased frequency as a pathogen of nosocomial infections (Lee et al. 2005), including septicaemias (Martín et al. 2003), pulmonary infection (Renom et al. 2007, Wong et al. 2010), meningitis (Weiss et al. 1996), endocarditis (Oliva et al. 2010), osteomyelitis (Fernández-Ayala et al. 2001), septic arthritis (Scholle 2007), keratitis (Heidemann et al. 1991), skin wounds (Moore et al. 2010) and intrauterine infections (Boltin et al. 2009). The first case of *C. striatum* in an uncomplicated urinary tract infection in an ambulatory patient without any other predisposing factors was recently reported (López et al. 2009).

Outbreaks caused by *C. striatum* have been reported in long-term hospitalised patients with prolonged exposure to broad-spectrum antibiotics and in intensive care units (ICU) (Leonard et al. 1994, Otsuka et al. 2006). The presence of multiple medical devices may facilitate

colonisation by *C. striatum* of the upper respiratory tract with subsequent invasive infection. Therefore, *C. striatum* should not be simply disregarded as a contaminant, especially when isolated as a pure growth in chronically debilitated patients with multiple medical devices *in situ* (Brandenburg et al. 1996, Renom et al. 2007).

An increase in the number of cases in which *C. striatum* has been isolated from clinical specimens from patients with varying degrees of immunocompromisation and severe infections has been observed in industrialised countries that can afford these types of studies. With the aid of molecular-biology-based techniques, the clonal nature of the isolates in nosocomial outbreaks has been unequivocally established (Brandenburg et al. 1996, Martín et al. 2003, Otsuka et al. 2006, Renom et al. 2007, Adderson et al. 2008, Campanile et al. 2009, Martins et al. 2009, Wong et al. 2010).

In South America, only reports from Brazil indicate the sporadic isolation of *C. striatum* from representative clinical sites of hospitalised patients with signs and symptoms of infection (Camello et al. 2003, Martins et al. 2009, Superti et al. 2009). In contrast to previous data observed by our research group (Camello et al. 2003), an unusual clustering of 14 patients in our teaching hospital within a period of nine months produced a sentinel signal that justified the study of a possible outbreak. Therefore, the microbiologic characteristics, resistance profiles and similarities among the genomes of 15 *C. striatum* strains isolated from these patients were investigated.

Financial support: CAPES, FAPERJ, CNPq, PAPER V-FIOCRUZ/ CNPq, SR-2/UERJ, PNP-CAPES/MEC, PAPER-FAPERJ/CAPES PVPB and HFM contributed equally to this work.

+ Corresponding author: guaraldi@uerj.br

Received 13 February 2012

Accepted 2 October 2012

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains - We reviewed the microbiological features of 15 *C. striatum* strains recovered from representative clinical sites of 14 hospitalised patients (50% male; 50% with fatal outcomes) with signs and symptoms of bacterial infection. The patients were hospitalised between August 2009-April 2010 in seven different wards of a 600-bed teaching hospital in Rio de Janeiro (RJ), Brazil (Table). All *C. striatum* isolates from the patients included in the study were detected using routine diagnostic cultures.

Bacterial phenotypic characterisation - *Corynebacterium*-like colonies were selected for further identification when they were grown in any quantity from normally sterile body fluid or when they were isolated in significant numbers or in pure culture from other specimens obtained at clinical sites where infection was suspected (Funke & Bernard 2007). All clinical samples yielding more than three organisms were regarded as contaminated and discarded (Thomson & Miller 2007). For quantitative bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cultures, a colony count $> 10^3$ colony-forming units (CFU) mL⁻¹ of potential pathogens was considered positive. Isolation of three species of microorganisms was classified as a polymicrobial infection of the lower respiratory tract. Microorganisms were identified from the urine cultures in cystine lactose electrolyte-deficient agar (Merck, Darmstadt, Germany) and were considered potential pathogens when the growth exceeded 10^4 CFU mL⁻¹ as the only isolate or $> 10^5$ CFU mL⁻¹ as the predominant isolate; in cases of nephropathies, $> 10^3$ CFU mL⁻¹ was also considered a potential pathogenic level. Blood cultures were always obtained in pairs, wherein at least one of the samples was collected through the central venous catheter, if present. Blood specimens were inoculated in Bactec Plus anaerobic/aerobic vials and processed in a Bactec 9240 continuous-monitoring system (Becton-Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD, USA). Other clinical specimens were inoculated onto a Columbia agar base with the addition of 5% sheep's blood and incubated at 37°C in a 3-5% CO₂ atmosphere and monitored for 72 h (Camello et al. 2003, Martins et al. 2009). Positive bacterial cultures for irregular Gram-positive rods were preliminarily characterised by colonial morphology, pigmentation, haemolysis, DNase activity and CAMP reaction with *Staphylococcus aureus* (Camello et al. 2003, Funke & Bernard 2007, Pimenta et al. 2008). Phenotypic characterisation was also performed using the semi-automated API Coryne System 3.0 (bioMérieux) with the API web decoding system (apiweb.biomerieux.com) (Almuzara et al. 2006, Funke & Bernard 2007, Campanile et al. 2009, Martins et al. 2009).

Susceptibility testing - Antimicrobial susceptibility profiles were determined by the disk diffusion method in cation-adjusted Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood. Breakpoints for the susceptible strains were used as suggested by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) for bacteria excluded from

tables 2A-K. As there is not yet a defined standard for interpreting these results, the standard proposed in CLSI document M45-A (ISBN 1-56238-607-7) was used (CLSI 2007). The breakpoints for *S. aureus* were considered in the cases of penicillin, oxacillin and ampicillin. For the other antimicrobial agents, we used the breakpoints for other microorganisms, but not *Haemophilus* spp or *Neisseria gonorrhoeae*, which had been validated by previous studies. Intermediate results were considered resistant (Camello et al. 2003, Martins et al. 2009). The antibiotics (Oxoid SA, Spain) tested included penicillin (10 U), ampicillin (30 µg), methicillin (5 µg), cefotaxime (30 µg), cefepime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), imipenem (10 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), linezolid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), moxifloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), rifampin (5 µg), fosfomicin (200 µg), vancomycin (30 µg), mupirocin (200 µg), tobramycin (10 µg), nitrofurantoin (300 µg) and ticarcillin/clavulanate (75 µg/10 µg).

Gene amplification and sequencing - *C. striatum* identification was confirmed by 16S rRNA and rpoB gene sequencing. Each strain was grown in Brain Heart Infusion broth by incubation for 24/48 h at 30°C and centrifuged for 5 min at 3,000 rpm. The pelleted bacteria were suspended in 500 µL of sterile water and subsequently boiled for 15 min for DNA extraction. Cell extracts were then immediately stored at -20°C for use in polymerase chain reaction (PCR) reactions. 16S rRNA gene was amplified using universal primers pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and pH (5'-AAG-GAGGTGATCCAGCCGCA), as described by Watts et al. (2000). The purified PCR product was sequenced by primer walking with the oligonucleotides using the following primers for sequencing: 1831 (5'-GAGGAAC-ACCGATGGCGAAGGC), 1832 (5'-GCCCCGTCA-ATTCCITTTGAGTT) (Watts et al. 2000) and 519r (5'-G(AT)ATTACCGCGG(C)GT)GCTG) and 1242f (5'-CACACGTGCTACAATGG) (Johnson 1994). The rpoB gene was amplified and sequenced using primers following procedures described previously (Khamis et al. 2004). The sequencing reactions were performed using a BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI-3730 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) following standard protocols. The 16S rRNA gene sequences were compared to those available in the National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov) using the BLAST algorithm and the Ribosomal Database Project II (rdp.cme.msu.edu/html). The rpoB gene sequences were only compared in the GenBank database.

Phylogenetic analysis - The 16S rRNA gene sequences were aligned by CLUSTALX (Thompson et al. 1997). The phylogenetic trees were constructed by using the neighbour-joining (NJ) genetic distance method and were made using the program MEGA 4.0 package with the option of complete deletion of gaps (Tamura et al. 2007). The Kimura two-parameter model was chosen for all NJ tree constructions. The reliability of each tree topology was checked with 1,000 bootstrap replications.

TABLE
 Characteristics of 15 *Corynebacterium striatum* strains isolated from infected patients within nosocomial environment

Number of patient/strain	Gender/age (years-old)	Date of bacteriological exams (month/year)	Hospital wards	Outcome (month/year)	Clinical specimens	Culture	API Coryne code	Phenotypic profiles	PFGE type
1/2023BR-RJ ^a	M/66	Aug/09	General ICU	Death Oct/09	Blood	Pure (NI)	0100105	Nit-/Pyz-/Suc+; MDR	I
2/2032BR-RJ	F/23	Aug/09	General ICU	Cure Sep/09	Urine	Pure (1.0 x 10 ⁶ CFU)	2100105	Nit-/Pyz+/Suc+; MDR	I
3/2038/39BR-RJ	F/54	Sep/09	Infectious diseases	Nov	Blood ^b	Pure (1.0 x 10 ⁶ CFU)	0100104	Nit-/Pyz-/Suc-; MDR	II
4/1954BR-RJ ^a	M/NI	Oct/09	Thoracic surgery	NI	Surgical wound secretion	Pure (NI)	3100105	Nit+/Pyz+/Suc+; MDS	IV
5/1958BR-RJ ^a	M/51	Nov/09	Thoracic surgery	NI	Tracheal aspirate ^b	(1.0 x 10 ⁶ CFU) + <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1.0 x 10 ⁵ CFU)	0100105	Nit-/Pyz-/Suc+; MDR	I
6/1959BR-RJ ^a	M/85	Dec/09	Cardiac ICU	Cure Mar/10	Tracheal aspirate ^b	Pure (1.0 x 10 ⁶ CFU)	0100105	Nit-/Pyz-/Suc+; MDR	I
7/1961BR-RJ ^a	F/37	Dec/09	Infectious diseases	NI	Urine	Pure (2.5 x 10 ⁵ CFU)	3100105	Nit+/Pyz+/Suc+; MDS	III
8/1974BR-RJ ^a	M/59	Dec/09	Urology	Death Mar/10	Tracheal aspirate ^b	Pure (4.0 x 10 ⁴ CFU)	0100105	Nit-/Pyz-/Suc+; MDR	I
9/1987BR-RJ ^a	F/50	Dec/09	Nursery 18	Death Dec/09	BAL	Pure (2.0 x 10 ⁵ CFU)	2100105	Nit-/Pyz+/Suc+; MDR	I
10/2369BR-RJ ^a	M/NI	Dec/09	General ICU	Cure Apr/10	Tracheal aspirate ^b	Pure (1.0 x 10 ⁶ CFU)	2100104	Nit-/Pyz+/Suc-; MDR	II
11/2539BR-RJ	F/NI	Dec/09	Nursery 18	Death Dec/09	Tracheal aspirate ^b	Pure (1.0 x 10 ⁶ CFU)	0100105	Nit-/Pyz-/Suc+; MDR	I
12/2063BR-RJ ^a	F/NI	Jan/10	General ICU	Death Jan/10	Tracheal aspirate ^b	Pure (1.0 x 10 ⁶ CFU)	2100105	Nit-/Pyz+/Suc+; MDR	I
13/2061BR-RJ	M/57	Feb/10	Thoracic surgery	Cure Feb/10	Tracheal aspirate ^b	Pure (1.0 x 10 ⁶ CFU)	2100105	Nit-/Pyz+/Suc+; MDR	I
14/2083BR-RJ; 2084BR-RJ	F/38	Apr/10	ICU II	Death Apr/10	Tracheal aspirate ^b ; CSF	(1.0 x 10 ⁶ CFU) <i>Pseudomonas</i> + <i>Staphylococcus</i> sp.; Pure (NI)	2100105	Nit-/Pyz+/Suc+; MDR	I

a: *C. striatum* strains identified by *16S rRNA* and *rpoB* gene amplification and sequencing; *b*: patients submitted to endotracheal intubation procedure; BAL: bronchoalveolar lavage; CFU: colony-forming units; CSF: cerebrospinal fluid; F: female; ICU: intensive care unit; M: male; MDR: multidrug resistant; MDS: multidrug susceptible; NI: not informed; Nit: nitrate reductase; Pyz: pyrazinamide; PFGE: pulsed-field gel electrophoresis; Suc: sucrose fermentation; -: negative reaction; +: positive reaction.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) - Genomic DNA was prepared following a method described previously (García-Crespo et al. 2005). The DNA was cleaved with *Swa*I (New England BioLabs) according to the manufacturer's instructions. PFGE was carried out in 0.5X TRIS-borate-EDTA-1.2% agarose gels at 13°C with a CHEF DRII system (Bio-Rad). The pulse times were 1-30 s over 22 h. A lambda DNA concatemer (New England BioLabs) was used as a molecular size marker. Similarities among macrorestriction patterns were identified according to the criteria established by Tenover et al. (1995).

Ethics - This study was developed in compliance with the Brazilian Government's Ethical Guidelines for research involving human beings (resolution of the National Health Council/Ministry of Health) and approved by the ethical research committee (INCA-CEP 008/06).

RESULTS

Epidemiological aspects - All 15 *C. striatum* clinical samples and the patients' ages, genders, hospital wards, outcomes, sites of isolation and associated microorganisms are displayed in chronological order in the Table. With the exception of four patients for whom age was not available, *C. striatum* strains were isolated only from adults (7 males and 7 females; half of whom were 50 years of age or older). Most of the strains were grown in pure culture ($n = 13$) and from tracheal aspirates ($n = 9$). Numerically predominant colonies of *C. striatum* were observed in two polymicrobial cultures from tracheal samples: one co-infected with *Klebsiella pneumoniae* and another with *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus* sp. *C. striatum* strains were also isolated from blood ($n = 1$), cerebrospinal fluid (CSF) ($n = 1$), BAL ($n = 1$), surgical wounds ($n = 2$) and urine ($n = 2$) samples. From the deceased patient, number 14, *C. striatum* strains were isolated from both the tracheal aspirate and the CSF (Table).

When considering bacterial growth in pure culture and the proximity between microbiological diagnosis and death of the patients, the possibility of a causal link between death and *C. striatum* infection was observed in five cases (3, 9, 11, 12 and 14) (Table). At least half of the patients previously infected with *C. striatum* died, indicating a high severity of illness and/or immune deficiency. All seven deaths during the period of study occurred in patients from whom *C. striatum* was isolated in a pure culture (3 in December 2009).

Fig. 1 presents the epidemic curve of the infections caused by *C. striatum*, suggestive of a nosocomial outbreak. Most of the *C. striatum* strains ($n = 6$) were isolated in December 2009 from patients from various hospital wards. The pathogen was found circulating mostly among inpatients admitted to the ICU and surgical wards ($n = 10$) from August 2009-April 2010 (Table). *C. striatum* infections were observed in the general ICU ($n = 4$), cardiac ICU ($n = 1$), ICU II ($n = 2$), thoracic surgery ($n = 3$), nursery 18 ($n = 2$), infectious diseases ($n = 2$) and urology ($n = 1$) wards.

Antimicrobial susceptibility, phenotypic and genotypic properties of *C. striatum* clinical isolates - MDR profiles for 21 of the antimicrobial agents tested were

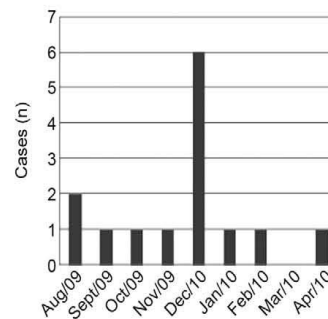


Fig. 1: epidemic curve for *Corynebacterium striatum* over time.

observed in 87% of the *C. striatum* strains that were susceptible only to vancomycin, linezolid and tetracycline. Two strains (1954BR-RJ surgical wound isolate and 1961BR-RJ urine isolate) were susceptible to most of the tested drugs (MDS) except mupirocin, fosfomycin and ticarcillin/clavulanate. Deaths occurred only in patients from whom MDR *C. striatum* strains were isolated in the blood, CFS, BAL and/or tracheal aspirate.

The phenotypic analysis of *C. striatum* strains revealed variability in the results of nitrate reductase and pyrazinamide (pyz) activities and/or sucrose fermentation (Table). To genotypically confirm the suspected *C. striatum* isolates, we performed 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing. GenBank accessions for the 16S rRNA and *rpoB* genes sequences were deposited: JF342692-JF342700 and JF342701-JF342709, respectively. The 16S rRNA sequences from the clinical isolates exhibited the highest similarity values to the type strain of *C. striatum* (ATCC 6940), ranging from 99.32-99.84%. The phylogenetic analysis, based on the 16S rRNA sequences, unambiguously demonstrated that the clinical isolates belonged to the *C. striatum* species, as illustrated in Fig. 2. A comparative analysis of the partial *rpoB* sequences for the clinical isolates revealed sequence similarities in the ranges of 97.08-97.15% with the type strain *C. striatum* (ATCC 6940).

PFGE analysis - The restriction endonuclease *Swa*I revealed four distinct PFGE profiles among the *C. striatum* isolates, which were designated I, II, III and IV. The PFGE profile I was the most frequently observed among the 15 strains (78.57%) isolated from the 14 patients (71.42%) included in this study (Fig. 3). PFGE analysis confirmed the isolation of a single clone of *C. striatum* (PFGE I) from the respiratory tract and CSF of the patient of case 14. Profiles II, III and IV differed by more than three bands from PFGE profile I by visual inspection. According to the interpretation criteria by Tenover et al. (1995), MDR clinical isolates belonging to profile II exhibited six bands of difference from the outbreak MDR strain and were considered potentially related to the outbreak. The MDS isolates belonging to profiles III and IV exhibited more than six bands of difference, indicating that they were unrelated to the outbreak strain (Fig. 3).

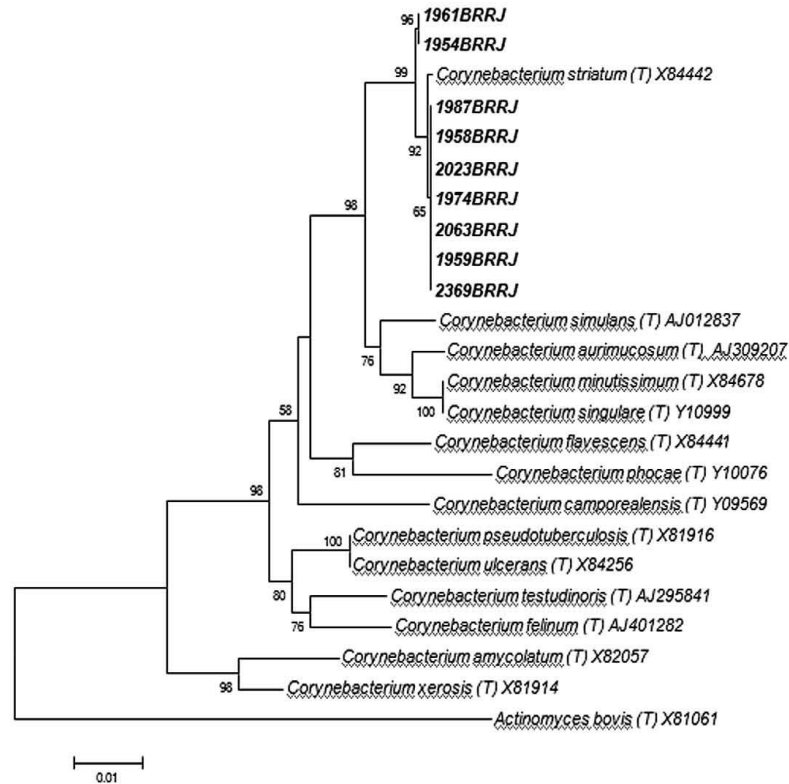


Fig. 2: phylogenetic tree based on neighbour-joining method using 16S rRNA gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Actinomyces bovis* (T) X81061 sequence was used as outgroup.

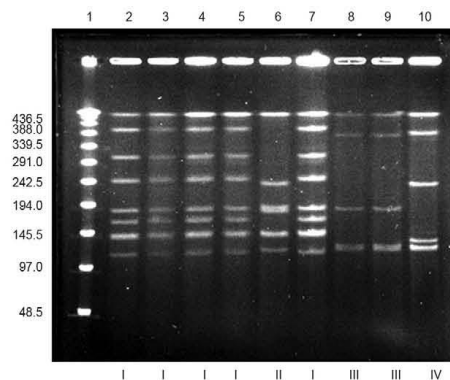


Fig. 3: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of Brazilian *Corynebacterium striatum* isolates. Lane 1: λ DNA ladder PFGE marker; 2-5, 7: profile I (isolates 1958, 1959, 1987, 1974 and 2539, respectively); 6: profile II (isolate 2369); 8, 9: profile III (isolate 1961); 10: profile IV (isolate 1954).

DISCUSSION

In Brazil, previous investigations revealed that 1.9% of samples isolated from varied clinical sources of cancer patients treated in a reference centre in RJ during a one-year period were positive for *C. striatum*, corresponding to one case of upper and three of lower respiratory tract infections and two cases of surgical wounds (Martins et al. 2009).

In the present study, we documented a nosocomial outbreak that includes a fatal case of systemic infection caused by *C. striatum* in a 600-bed teaching hospital in RJ. PFGE analyses of 15 *C. striatum* strains indicated the presence of four PFGE profiles, including two related clones of MDR strains (PFGE I and II). Our data demonstrated the predominance of PFGE type I comprising 11 MDR isolates that were mostly isolated from the ICU and surgical wards. The tracheal aspirate specimens obtained from patients with ventilator-associated respiratory tract colonisation or pneumonia were mostly (6 out of 7) PFGE type I. The possibility of a causal link between death and *C. striatum* (PFGE types I and II)

infection was observed on five occasions. Similar to our findings, previous studies also revealed ventilator support as a relevant risk factor for acquiring *C. striatum* infection (Brandenburg et al. 1996, Campanile et al. 2009, Wong et al. 2010).

Investigations dealing with infections caused by coryneform bacteria in paediatric oncology patients of St. Jude Children's Research Hospital (Tennessee, USA) indicated that most bacteraemia cases were due to *C. striatum*. These patients had complications related to their infections, including infection relapse and septic arthritis (Adderson et al. 2008). In the present study, *C. striatum* strains were not isolated from infants and new-borns and/or cancer patients. The pathogen was isolated from adults, with half of the patients (n = 7) 50 years of age or older. The isolation of pure, heavy-growth *C. striatum* in the absence of other pathogens together with clinical deterioration provided strong evidence for its pathogenic role in our patients. However, we could not ascertain how many of the fatalities could be attributed to *C. striatum* infection rather than to underlying conditions.

Except for the unvarying activity of vancomycin against corynebacteria, the variability in resistance to other classes of antimicrobial agents emphasises the need for the continuous surveillance of their resistance patterns. Although most reported *C. striatum* isolates have been susceptible to a wide range of antibiotics (Martínez-Martínez et al. 1995, 1996, Weiss et al. 1996), it has been suggested that the selective pressure exerted by prior antimicrobial treatment favours the overgrowth of *C. striatum* as a secondary coloniser in immunocompromised hosts. In this context, the emergence of MDR strains is of particular concern (Leonard et al. 1994, Campanile et al. 2009). Herein, the MDR phenotype of *C. striatum* strains was immediately observed and was responsible for the alarm that led to the subsequent laboratory surveillance of these strains. Most (87%) *C. striatum* strains were only susceptible to vancomycin, linezolid and tetracycline.

In Japan, Otsuka et al. (2006) reported variable rates of the susceptibility of *C. striatum* to β -lactams and aminoglycosides, with high levels of resistance to erythromycin, tetracycline, rifampin and ciprofloxacin, although all strains were sensitive to vancomycin. PFGE procedures identified 14 patterns of *C. striatum*, with types A, D and E associated with nosocomial outbreaks of respiratory origin and with subtypes A1, A2, D2 and E associated with resistance to a broad range of antibiotics. Moreover, Renom et al. (2007) observed in their samples that the criterion of multidrug resistance (resistance to 3 or more antibiotics of different families) applied to 100% of the strains isolated in nosocomial outbreaks, of which 65% were resistant to four or five different antibiotic groups, 6.9% were sensitive only to imipenem and vancomycin and 11% were sensitive only to vancomycin. According to the sensitivity patterns obtained by Otsuka et al. (2006), we observed in our samples that the criterion of multidrug resistance (resistance to 3 or more antibiotics of different families) applies to 87% of *C. striatum* (PFGE types I and II) strains isolated in the present nosocomial outbreak.

For *C. striatum*, no publically available database exists, such as PulseNet (cdc.gov/pulsenet), to enable the comparison of PFGE patterns observed in the different nosocomial outbreaks. Campanile et al. (2009) observed that the *SwaI*-PFGE profiles of *C. striatum* exhibit bands ranging in size from 48.5-533.5 kb. In our study, we obtained *SwaI*-PFGE profiles with bands ranging in size from over 97.0-533.5 kb. The absence of bands ranging in size from 48.5-97.0 kb suggested that the MDR *C. striatum* strains isolated in this nosocomial outbreak in Brazil were different from those isolated in Italy by Campanile et al. (2009). Moreover, the analysis of the phenotypic profiles of *C. striatum* indicated that the Brazilian strains were different from those isolated in the Netherlands (biotype: nitrate/pyz-positive and sucrose-negative; API code 3100104) (Brandenburg et al. 1996).

To our knowledge, this is the first Brazilian nosocomial outbreak caused by MDR *C. striatum* described in the literature. With the support of PFGE techniques, the clonal nature of the outbreak isolates was established, although a common source and the mode of transmission could not be determined. The present findings also highlight the importance of *C. striatum* as an emerging MDR nosocomial pathogen worldwide and the fact that different clones may be responsible for these nosocomial outbreaks.

REFERENCES

- Adderson EE, Boudreaux JW, Hayden RT 2008. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *Pediatr Infect Dis J* 27: 136-141.
- Almuzara MN, De Mier C, Rodríguez CR, Famiglietti AM, Vay CA 2006. Evaluation of API Coryne System version 2.0 for diphtheroid gram-positive rods identification with clinical relevance. *Rev Argent Microbiol* 38: 197-201.
- Boltin D, Katzir M, Bugoslavsky V, Yalashvili I, Brosh-Nissimov T, Fried M, Elkayam O 2009. *Corynebacterium striatum* - a classic pathogen eluding diagnosis. *Eur J Intern Med* 20: 49-52.
- Brandenburg AH, van Belkum A, van Pelt C, Bruining HA, Mouton JW, Verbrugh HA 1996. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J Clin Microbiol* 34: 2089-2094.
- Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA 2003. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol* 34: 39-44.
- Campanile F, Carretto E, Barbarini D, Grigis A, Falcone M, Goglio A, Venditti M, Stefani S 2009. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg Infect Dis* 15: 75-78.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute 2007. *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*. M45-A, CLSI, Wayne, 15 pp.
- Fernández-Ayala M, Nan DN, Fariñas MC 2001. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. *Am J Med* 111: 167.
- Funke G, Bernard KA 2007. Coryneform gram-positive rods. In PR Murray, EJ Baron, JH Tenover, ML Landry, MA Pfaller, *Manual of clinical microbiology*, 9th ed., ASM Press, Washington DC, p. 485-514.
- García-Crespo D, Navas J, Gradillas G, Juste RA 2005. Technical note: molecular typing of *Corynebacterium bovis* isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Dairy Sci* 88: 1705-1707.

- Heidemann DG, Dunn SP, Diskin JA, Aiken TB 1991. *Corynebacterium striatum* keratitis. *Cornea* 10: 81-82.
- Johnson JL 1994. Similarity analysis of rRNAs. In P Gerhardt, RGE Murray, WA Wood, NR Krieg, *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington DC, p. 691.
- Khamis A, Raoult D, La Scola B 2004. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 42: 3925-3931.
- Lee PP, Ferguson Jr DA, Sarubbi FA 2005. *Corynebacterium striatum*: an underappreciated community and nosocomial pathogen. *J Infect* 50: 338-343.
- Leonard RB, Nowowiejski DJ, Warren JJ, Finn DJ, Coyle MB 1994. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. *J Clin Microbiol* 32: 164-169.
- López AB, Gil Ruiz MT, Vega PL, Fajardo OM 2009. Cystitis and haematuria due to *Corynebacterium striatum*. A case report and review. *Actas Urol Esp* 33: 909-912.
- Martin MC, Melon O, Celada MM, Alvarez J, Mendez FJ, Vazquez F 2003. Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. *J Med Microbiol* 52: 599-602.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Bernard K, Suárez AL 1996. Antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium striatum*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2671-2672.
- Martínez-Martínez L, Suárez AI, Winstanley J, Ortega MC, Bernard K 1995. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. *J Clin Microbiol* 33: 2458-2461.
- 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.
- Moore K, Hall V, Paul A, Morris T, Brown S, McCulloch D, Richardson MC, Harding KG 2010. Surface bacteriology of venous leg ulcers and healing outcome. *J Clin Pathol* 63: 830-834.
- Oliva A, Belvisi V, Iannetta M, Andreoni C, Mascellino MT, Lichtner M, Vullo V, Mastroianni CM 2010. Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. *J Clin Microbiol* 48: 4669-4671.
- Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Ezaki T, Kimura S 2006. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54: 109-114.
- Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata Jr R, Camello TC, Mattos-Guaraldi AL 2008. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Leti Appl Microbiol* 46: 307-311.
- Renom F, Garau M, Rubi M, Ramis F, Galmes A, Soriano JB 2007. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 45: 2064-2067.
- Scholle D 2007. A spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum*. *J Clin Microbiol* 45: 656-658.
- Superti SV, Martins DS, Caierao J, Soares F, Prochnow T, Cantarelli VV, Zavascki AP 2009. *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 115-116.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Thomson Jr RB, Miller M 2007. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller, *Manual of clinical microbiology*, ASM Press, Washington DC, p. 286-330.
- Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbach S 2000. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci* 83: 2373-2379.
- Weiss K, Labbé AC, Laverdière M 1996. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clin Infect Dis* 23: 1246-1248.
- Wong KY, Chan YC, Wong CY 2010. *Corynebacterium striatum* as an emerging pathogen. *J Hosp Infect* 76: 371-372.

3.2 Artigo científico - Identification of *Nocardia* species by Multilocus Sequence Analysis and an overview of Human Nocardiosis in Brazil.

Identification of *Nocardia* species by Multilocus Sequence Analysis and an overview of Human Nocardiosis in Brazil.

Autores: Baio PVP, Ramos JN, Soriano MF, Ladeira E M, Souza MC, Camello TCF, Ribeiro MG, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL.

Revista: PLoS Neglected Tropical Diseases (Submetido) (Qualis A1)

RESUMO

Nocardia sp. causa uma variedade de infecções supurativas dos seres humanos. Nos países tropicais, a incidência de nocardiose permanece desconhecida, embora a doença tenha sido relatada na maior parte das regiões do mundo. No Brasil, a escassez de relatos clínicos de nocardiose sugere que este gênero pode ser subestimado como causa de doenças humanas e/ou negligenciado ou erroneamente identificado em amostras laboratoriais. Identificação das espécies de *Nocardia* é difícil devido a rápida mudança em sua taxonomia, fracasso da análise da sequência do gene 16S rRNA e análise dos ácidos graxos celulares para discriminar muitas espécies, e a falta de confiabilidade dos testes bioquímicos. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies de *Nocardia* de infecções humanas pela análise da sequência multilocus (genes 16S rRNA, *gyrB*, *secA1* e *hsp65*), bem como caracterizar seus perfis fenotípicos e antimicrobianos. Uma revisão geral de nocardiose humana no Brasil entre os anos 1970 a 2013 mostraram que a maioria (55,56%) dos isolados humanos brasileiros foram identificados como *Nocardia* sp. Neste estudo, a análise fenotípica identificou os isolados clínicos como *N. nova* (cepa 1046BRRJ), *N. asteroides* (cepas 1047BRRJ, 1048BRRJ), *N. cyriacigeorgica* (cepa 1261BRRJ), *N. pseudobrasiliensis* (cepa 78408BRRJ) e *Nocardia* sp. (cepas 1694BRRJ, 2042 BRRJ). A análise molecular revelou maiores valores encontrados de

similaridade com sequências dos genes *gyrB*, 16S rRNA, *secA1* e *hsp65* de todas as cepas analisadas com sequências de cepas tipo. A caracterização molecular de quatro loci (*gyrB*-16S-*secA1*-*hsp65*) permitiu a identificação das espécies *N. nova* (cepas 1046BRRJ, 1047BRRJ, 1048BRRJ), *N. cyriacigeorgica* (cepas 1261BRRJ e 78408BRRJ), *N. asiatica* (cepa 1694BRRJ) e *N. exalbida/gamkensis* (cepa 2042BRRJ). Os dados indicaram que a *Nocardia* especiação por MLSA pode alterar a identificação bioquímica inicial imediata para a maior parte das estirpes testadas brasileiras. Os resultados do método de difusão em disco mostrou 100% de sensibilidade ao sulfametaxazol-trimetoprim, que é o mais amplamente prescrito para o tratamento antimicrobiano da nocardiose. Análise PFGE das cepas de *N. Nova* isoladas de diferentes materiais clínicos de um paciente revelou dois perfis distintos: PFGE A (cepa 1046BRRJ/BAL) e PFGE B (cepas 1047BRRJ/secreção nodular e 1048BRRJ/aspirado traqueal). Embora o Brasil seja o quinto maior país do mundo em termos de massa de terra e população, as formas pulmonares, extrapulmonares e sistêmicas de nocardioses foram relatadas em apenas seis dos 26 estados brasileiros nos anos 1970 a 2013. Ao menos 33,8% dos 46 casos de nocardioses provaram ser fatais. A doença pulmonar foi a forma mais frequente de apresentação da infecção por *Nocardia* sp. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro relato de identificação de espécies de *Nocardia* por MLSA no Brasil. Infecções humanas no Brasil pode ser, certamente, devido a *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica* e *N. exalbida/gamkensis*. A maioria das espécies foram relacionados com doença pulmonar, exceto para a cepa identificada como *N. asiatica* que foi isolada de um paciente com abscesso cerebral. Curiosamente, a co-infecção por dois clones podem ocorrer em pacientes com doença devida a *N. nova*. Nocardiose pode ser mais comum no Brasil e em outros países tropicais em desenvolvimento do que é atualmente reconhecido e MLSA pode ser usado de forma mais ampla como um método para a identificação e classificação de gênero *Nocardia*.

TITLE PAGE**IDENTIFICATION OF NOCARDIA SPECIES BY MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS AND AN OVERVIEW OF HUMAN NOCARDIOSIS IN BRAZIL**

Paulo Victor Pereira Baio^{1,3,4}, Juliana Nunes Ramos^{1,3}, Louisy Sanches dos Santos¹, Morgana Fonseca Soriano¹, Elisa Martins Ladeira³, Mônica Cristina Souza¹, Thereza Cristina Ferreira Camello^{1,2}, Marcio Garcia Ribeiro⁵, Raphael Hirata Junior¹, Verônica Viana Vieira³, Ana Luíza Mattos-Guaraldi¹

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia. Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC, Centro Colaborador para Difteria da CGLAB/SVS/MS, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Laboratório de Bacteriologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde – INCQS -Departamento de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ Ministério da Defesa, Laboratório Químico Farmacêutico do Exército, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁵ Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, Brazil.

Running title: MLSA identification of *Nocardia* in Brazil

Keywords: *Nocardia* sp.; Bacterial identification; MLSA; PFGE

Correspondence to: **Prof. Dr. Mattos-Guaraldi AL**

Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC. Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, RJ, Brazil. CEP 20 551-030. Phone: +55 21 2868-8280;

Fax: +55 21 2868-8376;

E-mail: guaraldi@uerj.br

ABSTRACT

Nocardia sp. causes a variety of suppurative infections of humans. In tropical countries, the incidence of nocardiosis remains unknown although the disease has been reported from most regions of the world. In Brazil, the paucity of clinical reports of nocardiosis suggests that this genus may be underestimated as a cause of human diseases and/or either neglected or misidentified in laboratory specimens. *Nocardia* species identification is difficult due to a complex and changing taxonomy, the failure of 16S rRNA and cellular fatty acid analysis to discriminate many species and the unreliability of biochemical testing. The aim of this study was to identify *Nocardia* species from human infections by multilocus sequence analysis (16S rRNA, *gyrB*, *secA1* and *hsp65* genes) as well as to characterize their phenotypic and antimicrobial susceptibility profiles. An overview of human nocardiosis in Brazil from 1970 to 2013 indicated the majority (55.56%) of the Brazilian human isolates identified as *Nocardia* sp. Presently, phenotypic analysis identified the clinical isolates as *N. nova* (1046BRRJ), *N. asteroides* (1047BRRJ, 1048BRRJ), *N. cyriaciorgica* (1261BRRJ), *N. pseudobrasiliensis* (BRRJ78408 strains) and *Nocardia* sp. (1694BRRJ strain, 2042BRRJ strain). Molecular analysis revealed highest similarity values found to *gyrB*, 16S rRNA, *secA1* and *hsp65* gene sequences of all strains analyzed with type strains sequences. Molecular characterization of four-locus (*gyrB*-16S-*secA1*-*hsp65*) has provided the species identification of *N. nova* (1046BRRJ, 1047BRRJ, 1048BRRJ strains), *N. cyriaciorgica* (1261BRRJ and 78408BRRJ strains), *N. asiatica* (1694BRRJ strain) and *N. exalbida/gamkensis* (2042BRRJ strain). Data indicated that *Nocardia* speciation by MLSA may change the initial biochemical identification as shown for most of the Brazilian strains tested. Results of the disk diffusion method showed 100% susceptibility trimethoprim-sulphametaxazole, which is the most widely prescribed for nocardiosis antimicrobial therapy. PFGE analysis of *N. nova* strains isolated from different clinical specimens of one patient

revealed two distinct profiles: PFGE A (1046BRRJ/BAL strain) and PFGE B (1047BRRJ/nodule secretion and 1048BRRJ /tracheal aspirate strains). Although Brazil is the world's fifth-largest country in terms of land mass and population, pulmonary, extrapulmonary and systemic forms of nocardiosis were reported only in six of the 26 Brazilian states from 1970 to 2013. A least 33.8% of these 46 cases of nocardiosis prove fatal. Pulmonary disease was the most frequent form of presentation of infection due to *Nocardia* sp. To our knowledge, this is the first report on identification of nocardia species by MLSA in Brazil. Human infections in Brazil may be certainly due to *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica* and *N. exalbida/gamkensis*. Most of the species were related with pulmonary disease, except for *N. asiatica* that was isolated from a patient with brain abscess. Interestingly, coinfection by two clones may occur in patients with disease due to *N. nova*. Nocardiosis may be more common in the Brazil and other developing tropical countries than is currently recognized and MLSA should be used more extensively as an alternative method for the identification and classification of *Nocardia* genus.

INTRODUCTION

Nocardia is a ubiquitous group of environmental bacteria that can cause opportunistic infections in humans and other animals [1], [2], [3]. To date, *Nocardia* genus comprises more than 90 validly described species, including at least 30 species recognized as human opportunistic pathogens. New *Nocardia* species continue being described [2], [4].

Human nocardiosis is primarily recognized as an opportunistic disease that is intimately related to immune dysfunctions [5]. The incidence of nocardiosis varies geographically according to several factors, such as the incidence of HIV infections, transplant, cancer and rheumatic diseases, as well as climate, socio-economic conditions and

laboratory procedures for *Nocardia* detection and identification. Some reports have described an increase in the occurrence of such infections [6], [7], while others have shown that the number of nocardiosis cases has become constant [8], [9].

Although nocardiosis typically occurs in immunosuppressed patients, infection may develop in immunocompetent patients as well. The most common clinical presentations in immunocompetent patients are superficial cutaneous disease, lymphocutaneous disease as well as mycetomas and eye infections that may occur after traumatic inoculation and are mainly described in tropical regions [6], [2].

Accurate identification of *Nocardia* species has become increasingly important for studies of antimicrobial susceptibility, clinical and epidemiological investigations. The molecular methodologies have provided a number of taxonomic changes in the genus *Nocardia*. Wallace and colleagues [10] reported that *N. asteroides* exhibited different antimicrobial susceptibilities patterns. This group of bacteria known as complex *N. asteroides* is responsible for the most of *Nocardia* infections in humans [11]. *N. asteroides* complex was then separated and rearranged in different species: *N. asteroides*, *N. abscessus*, *N. brevicatena paucivorans* complex, *N. nova* complex (which includes *N. nova*, *N. veterana*, *N. africana*, *N. kruczakiae*), *N. transvalensis* complex, *N. farcinica* and *N. ciriacygeorgica*. *N. asteroides* drug pattern type VI, which had long been recognized as a common and significant pathogen in the United States, belonged to the species *N. ciriacygeorgica* [12]. Studies based on molecular methodologies have shown that *N. ciriacygeorgica* has been the species most commonly found causing nocardiosis humans and animals in various parts of the world [13], [14], [15], [16], [3]. Nevertheless, other species, such as *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. transvalensis*, *N. otitidiscaviarium* have also been reported with high frequency in nocardiosis [14], [17], [2].

The paucity of clinical reports of nocardiosis in Brazil suggests that this genus may be underdiagnosed and underestimated as a cause of human infections. Such information has led us to identify *Nocardia* species from human infection by multilocus sequence analysis (16S rRNA, *gyrB*, *secA1* and *hsp65* genes) as well as to characterize their phenotypic and antimicrobial susceptibility profiles. An overview of the Brazilian reports on nocardia species related to human infections was also accomplished.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolation and phenotypic and antimicrobial susceptibility assays – Suspect *Nocardia* strains ($n=7$) recovered from representative clinical sites with signs and symptoms of bacterial infection were sent to a Brazilian reference laboratory (LDCIC/FCM/UERJ) to perform laboratory testing. The 1046BRRJ, 1047BRRJ and 1048BRRJ strains were recovered from three different clinical specimens (bronchoalveolar lavage fluid - BAL, nodule secretion and tracheal aspirate, respectively) of only one patient (**Table 1**). In this study were only included the clinical isolates grown in any quantity from normally sterile body fluid and/or grown in pure culture or recovered predominantly from other clinical sites.

The colonies grown in defibrinated sheep blood agar (5%) suggestive of the genus *Nocardia* were submitted to microscopic examination (Gram and Kinyoun acid-fast staining methods). Gram-positive branched bacilli (presenting aerial hyphae and partially acid fast bacilli) were evaluated for their ability to grow in lysozyme broth, catalase and urease production in addition to hydrolysis of casein, tyrosine, xanthine, gelatin, esculin, and hypoxanthine; growth at 45°C; acid production on glucose, adonitol, arabinose, cellobiose, dulcitol, erythritol, galactose, glycerol, inositol, lactose, maltose, mannitol, melibiose,

raffinose, rhamnose, sorbitol, sucrose, trehalose, and xylose; PYR; citrate and nitrate reduction [18], [19], [20], [21], [22], [12].

The susceptibility studies were performed by diffusion disk method using ampicillin, gentamicin, tobramycin, amikacin, imipenem, ciprofloxacin, trimethoprim-sulphamethaxazole (TMP-SMX) and erythromycin, in accordance with guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [18], [23].

Molecular analysis – Molecular characterization of *Nocardia* strains was accomplished by sequencing of the 16S rRNA, *secA1*, *gyrB*, and *hsp65* genes. DNA extraction, primer design, the PCR parameters employed to amplify *Nocardia* 16S rRNA gene and sequencing of amplified PCR products following their purifications were performed as previously described [24]. The *secA1*, *gyrB* and *hsp65* genes were amplified and sequenced using primers following procedures [25], [26], [27]. The sequencing reactions were performed with BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI-3730 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) by standard protocols. The 16S rRNA gene sequences were compared to those available in the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST algorithm and the Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>). *secA1*, *gyrB*, and *hsp65* genes sequences were only compared in GenBank database.

MLSA experiments - The 16S rRNA, *gyrB*, *hsp65*, and *secA1* genes sequences were aligned by CLUSTALX [28]. The phylogenetic trees were constructed by using neighbor-joining genetic distance method and they were made by using the program MEGA 4.0 package with the option of complete deletion of gaps [29]. The Kimura two-parameter model was chosen for all NJ tree constructions. The reliability of each tree topology was checked by 1000

bootstrap replications. The 16S rRNA, *secA1*, *gyrB* and *hsp65* genes sequences from isolates have been deposited in the EMBL/GenBank database under the accession numbers: JQ638645 to JQ638651.

In BioEdit software, sequences were aligned and trimmed to define start and end positions to field fragments of the following sizes: 1389 bp for 16S rRNA, 965 bp for *gyrB*, 401 bp for *hsp65* and 431 bp for *secA1*. The trimmed sequences were concatenated in the order 16S-*gyrB*-*hsp65*-*secA1* to generate a 3.189-bp sequence. Rooted trees obtained using individual gene sequences and concatenated sequences were generated by the neighbor-joining (NJ) algorithm following Kimura 2-parameter (K2P) correction and the maximum-parsimony (MP) algorithm using BioNumerics software. Bootstrap analysis (1000 replicates) was used to assess the robustness of the clusters.

Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) - For PFGE analysis, genomic DNA was prepared using methods described by Blumel and co-workers [30] with modifications. Bacterial growth from a blood agar plate was resuspended into 1.5 ml of EC buffer to a density of no. 5 McFarland standard. The purified DNA was cleaved with *Xba* I (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PFGE was carried out in 0.5X TRIS-borate-EDTA-1.1% agarose gels at 13°C by a CHEF DRII system (Bio-Rad). The pulse times were 1s to 30s over 20h. A lambda DNA concatemers (New England BioLabs) was used as a molecular size marker. Similarities among macrorestriction patterns were identified according to established criteria by Tenover and co-workers [31], PFGE profiles were defined as those isolates with patterns differing by more than 3 fragments. The BioNumerics Fingerprinting software (Version 6.5, Applied Math, Austin, TX) was used to confirm the findings provided by visual observation. The similarity index of the strains was calculated using the Dice correlation coefficient option of the software with a position tolerance of 1% and an optimization of 1.00%. The

unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA) was used to construct a dendrogram.

RESULTS

Phenotypic profiles - Preliminary analysis showed microorganisms as aerobic, Gram-positive branched and filamentous bacilli and weakly acid fast by modified Kinyoun. **Table 1** summarizes the phenotypic profiles presented by the seven suspect *Nocardia* strains recovered from representative clinical sites of patients with signs and symptoms of nocardiosis.

Antimicrobial susceptibility profiles - *Nocardia* sp. strains showed susceptibility to amikacin, gentamicin, trimethoprim-sulphamethazole (TMP-SMX) and imipenem; variable results were demonstrated for the other antimicrobial agents tested (**Table 1**). Resistance to tobramycin was only observed for the clinical strains identified as *N. nova* (1046BRRJ, 1047BRRJ, 1048BRRJ strains) while susceptibility to erythromycin was observed for the *N. exalbida/gamkensis* 2042BRRJ strain.

MLSA – **Table 2** shows the highest similarity values found to *gyrB*, 16S rRNA, *secA1* and *hsp65* gene sequences of all strains analyzed with type strains sequences. Molecular characterization by four-locus (*gyrB*-16S-*secA1*-*hsp65*) has provided the species identification *N. nova* (1046BRRJ, 1047BRRJ, and 1048BRRJ strains), *N. cyriacigeorgica* (1261BRRJ and 78408BRRJ strains), *N. asiatica* (1694BRRJ strain) and *N. exalbida/gamkensis* (2042BRRJ strain). The NJ tree based on the concatenated nucleotide sequences of *gyrB*-16S-*secA1*-*hsp65* genes had nearly all branches supported by a bootstrap

value of 100% confirming the identification of the strains analyzed (Figure 1). The 2042BRRJ strain presented higher 16S rRNA sequence similarity with four *Nocardia* species: *N. exalbida*, *N. gamkensis*, *N. arthritidis* with values ranging from 99.00 to 99.51% (Table 2). In phylogenetic analysis based on concatenated sequence genes, the 2042BRRJ strain, *N. exalbida*, *N. gamkensis* and *N. arthritidis* type strains appear in a branch showing high bootstrap value (100%). Although the 2042BRRJ strain identification has not been concluded, it seems more related to *N. exalbida* and *N. gamkensis*, as shown in Figure 1.

PFGE profiles - The PFGE analysis was performed to determine the genetic relatedness of *N. nova* strains. The restriction endonuclease *XbaI* revealed two distinct PFGE profiles among the *N. nova* strains, which were designated A (1046BRRJ / BAL isolate) and B (1047BRRJ and 1048BRRJ / nodule secretion and tracheal aspirate isolates, respectively) (Figure 2).

DISCUSSION

Definitive bacteriological diagnosis of nocardiosis depends upon the isolation and identification of the causal agent from clinical material and the laboratory at which the specimens are analyzed. *Nocardia* species growth culture media is slow and incubation should be continued for at least two weeks [5], [2]. Premature discontinuation of culture will decrease the sensitivity of recovery and may contribute to underestimation of the true incidence of nocardiosis. Most of the laboratories discard bacterial cultures which are negative after 48 h and *Mycobacterium tuberculosis* (TB) laboratories do not process sputum specimens without decontaminating non-mycobacterial pulmonary pathogens [32], [33].

Furthermore, modified acid-fast (Kinyoun) and Gram staining of specimens are particularly important to provide a rapid, economical and presumptive diagnosis while awaiting the results of the culture [34], [5]. Different from mycobacteria, *Actinomyces* can be

more easily differentiated from *Nocardia* as they are not stained by modified acid-fast stain [22], [6], [35], [36].

In accordance to Kiska and co-workers [18] no single method could accurately identify all *Nocardia* species associated with human and animal infections. In that opportunity, a combination of antimicrobial susceptibility pattern, colony pigment and a group of biochemical tests was suggested to identify all isolates to the species level.

However, most recent studies revealed that *Nocardia* speciation may require confirmation by molecular techniques, which may change the initial biochemical identification [22], [6], [37]. Thus, various molecular methods have been proposed to provide accurate *Nocardia* species identification [17], [14], [25]. Sequence analysis of 16S rRNA performed by Liu and co-workers [37] showed that phenotypic identification assays produced 37% misidentification of *Nocardia* species. Although the sequence of the 16S rRNA gene has been broadly used to discriminate *Nocardia* species, misidentification of microorganisms may occur due to high sequence similarity and multiple but different copies of this gene [2], [38]. In attempt to improve the identification of the increasing number of species of genus *Nocardia*, the analysis of other housekeeping genes such as the 65-kDa heat shock protein gene (*hsp65*), essential secretory protein A (*secA1*), gyrase B (*gyrB*) has been also performed [14], [25], [26], [27]. Sequence analysis of multiple housekeeping genes provided more informative nucleotide sites and buffers against the distorting effects of homologous recombination and horizontal gene transfer of a single gene [38], [39]. In this context, MLSA has been regarded as an alternative technique for the identification and classification of diverse group of bacteria, including *Nocardia* genus [14], [40].

Like many other developing countries, nocardiosis incidence is still unknown in Brazil. To our knowledge, this is the first report of identification of nocardia species by MLSA in our country. In attempt to collect some information on this Public Health issue, the

Table 3 presents a complete overview of Brazilian published *case reports* of nocardiosis, excluding mycetomas. A total of 27 studies concerning 58 cases of *Nocardia* infection were found available in the literature during the period of 1970 to 2013. A large series of nocardial infections that occurred from 1978 to 1998 was reported by Chedid and co-workers [41]. Solid organ transplantation was the most common underlying condition before the advent of an effective medical therapy, the introduction of cyclosporine and prophylaxis with TMP-SMZ [5], [42], [43], [44]. Batista and co-workers [45] found only one case of nocardiosis among 1046 kidney and 708 liver transplants patients registered in four Brazilian centers from different geographical areas from 2001 to 2006. In those institutions, cotrimoxazole prophylaxis was routinely used for 6 month after transplantation and in situations where there was an increase in immunosuppressive therapy for rejection.

Most of the Brazilian studies indicated pulmonary disease as the major clinical presentation of nocardiosis in our country (Table 3). In some developing countries, where other chronic lung diseases, particularly TB are prevalent, pulmonary nocardiosis may be more common than is currently recognized, especially in zones with HIV-associated tuberculosis. One of the reasons for this occurrence is that the pulmonary manifestation of nocardiosis is often confused with TB [33], [35]. Clinical, radiological and histopathological findings are not sufficient for the recognition of pulmonary nocardiosis, suggesting that a considerable percentage of patients presenting symptoms of chronic lung disease could be suffering from pulmonary nocardiosis [5], [46]. In some African countries, where HIV-related tuberculosis occurs frequently, there are reports of high prevalence of nocardiosis [33], [47], [48]. Another issue for the recognition of pulmonary nocardiosis refers to the difficulty of laboratory diagnosis. Some authors have emphasized that in regions where HIV-related tuberculosis occurs, *Nocardia* strains are missed or misidentified in clinical specimens and it

is possible that some patients diagnosed as smear-negative pulmonary TB actually have nocardiosis [33], [47], [48], [49], [50], [51].

In Brazil, Jacomelli and co-workers [52] investigated 286 patients with clinical or radiological suspicion of TB who were unable to produce sputum or with negative smear. They found 7% infections caused by *Pneumocystis*, fungi and *Nocardia*. In 2011, the tuberculosis incidence in Brazil was 37.2/100,000 inhabitants, however, there were Brazilian cities where the incidence of tuberculosis was much higher than that found in the São Paulo city (39.3/100,000) Rio de Janeiro (70.7/100,000 inhabitants), Porto Alegre (109.2/100,000), Recife (93.2/100,000) among others cities [53], [54]. Unfortunately, there are no other studies on microbiological aspects of the infections diagnosed as smear-negative pulmonary TB so that this approach could be evaluated in different states of Brazil.

Brazil's AIDS treatment program has been cited widely as the developing world's largest and most successful AIDS treatment program. The program guarantees free access to highly active antiretroviral therapy (HAART) for all people living with HIV/AIDS in need of treatment [55], [56]. This may reflect in the few cases of nocardiosis in patients with HIV reported in Brazil.

Pulmonary and disseminated nocardiosis have also been recently reported in immunocompetent patients in different countries [33], [57], [58], [59]. Although frequently in India, cases of keratitis are relatively rare in another countries [60], [61]. In Brazil, only four cases of eye infection due to *Nocardia* were reported [62], [63], [64], [65]. Mycetomas cases caused by *Nocardia* sp. have been described in São Paulo and other cities [41], [66], [67], [68], [69], [70], [71], [72], [73], [74], [75].

Nocardia species differ in their responses to antimicrobials and susceptibility tests for all clinically significant *Nocardia* isolates are recommended. However, due to the slow growth of these bacteria, clinicians usually start treatment empirically when these results are

not yet available [13]. Nocardiosis treatment is usually prolonged and TMP-SMX is the most widely prescribed for therapy of nocardiosis [13], [22], [76]. For patients with serious diseases clinicians recommend a three-drug regimen consisting of TMP-SMX, amikacin, and either ceftriaxone or imipenem, with no report of resistance to this combination [2], [8]. In our study, 92% strains were sensitive to imipenem and 100% sensitive to amikacin and TMP-SMX. Some reports have described high levels of sulfonamide resistance among numerous *Nocardia* species [77], [78]. Nevertheless, those values have been contested by Brown-Elliott and co-workers [76] that suggested that these findings may be associated with difficulty in the laboratory interpretation of *in vitro* MICs for TMP-SMX and sulfamethoxazole. Nowadays, TMP-SMX remains the drugs of choice for nocardiosis treatment and prophylaxis against *Nocardia* infection in immunocompromised patients [44], [76], [79].

The Brazilian reported cases displayed in Table 3 showed the majority (55.56%) of the strains were identified as *Nocardia* sp. In the present investigation, the use of varied conventional biochemical algorithms described by different authors [18], [19], [20], [21], [22] led to the misidentification of five out of the seven Brazilian strains tested.

In Brazil, molecular analysis for identification of *Nocardia* species was done only in a few opportunities [3], [80], [81]. In the present study, the identification system based on MLSA methodology was capable of differentiating currently recognized *Nocardia* species. Data indicated that all *Nocardia* strains were identified by phylogenetic analysis based on concatenated *gyrB*-16S-*secA1 hsp65* gene sequences as recommended Mc Taggart and co-workers [14]. MLSA has provided the identification of the following species: *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica* and *N. exalbida/gamkensis*. Most of the species were related with pulmonary disease, except for *N. asiatica* that was isolated from a patient with brain abscess. To our knowledge, this is the first Brazilian report of *N. cyriacigeorgica* human isolates. Two strains were identified by MLSA as *N. cyriacigeorgica*, including one isolated from a patient

with pulmonary disease. In Brazil, *N. cyriacigeorgica* was previously isolated only from bovine bulk tank milk [3].

Similar to observations performed by Mc Taggart and co-workers [14], MLSA did not distinguish neither the *N. arthritidis*, *N. gamkensis*, and *N. exalbida* type strains. Although the 2042BRRJ strain seemed more related to *N. exalbida* and *N. gamkensis* species, they formed a cluster together with *N. arthritidis* supported by a bootstrap 100%. While sequence analysis of additional genes may demarcate these type strains, failure to do so would prompt an extensive evaluation of the legitimacy of their species status. Mc Taggart and colleagues [14] demonstrated that MLSA scheme revealed two sets of type strains that fail to form distinct clusters. One of these sets was comprised by *N. arthritidis* DSM 44731T, *N. gamkensis* DSM 44956T, *N. exalbida* DSM 44883T and 7 clinical isolates formed a cluster with 98% bootstrap support.

Also, in this opportunity the genetic relationship of *N. nova* strains recovered from three different clinical specimens of a patient was investigated by using PFGE method. Like so, surprisingly we observed that the patient presented pulmonary coinfection by two clones of *N. nova* and one of these (PFGE profile B) was disseminated and also detected in nodular discharge.

Interestingly, the overview of literature showed nocardiosis reported cases only in six of the 26 Brazilian states. During the last decade, only 14 cases were reported in the states of Pernambuco, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul. Data highlight the fact that nocardiosis remain underdiagnosed in most of our country presenting continental dimensions and large socioeconomic differences.

Therefore, knowledge of the clinical impact of nocardiosis remains scarce and fragmentary mainly due to the difficulties in clinical and laboratorial diagnosis. Reports have suggested that there is usually a delay in the diagnosis of nocardiosis which is attributed to

difficulties to clinical, radiological and microbiological diagnose. The usual reason for requesting culture studies for the detection of *Nocardia* spp. is that a patient has not responded to the usual anti-bacterial or anti-TB treatment [13], [82]. In conformity with Wilson [11], the isolation of *Nocardia* from the respiratory tract or other body source, independent of the immunologic status of the patients, should not be discarded as a contaminant or commensal organism. In case of difficulties with *Nocardia* identification, the suspect isolates should be conducted to a Clinical Reference Laboratory. Optimal therapeutic strategies depend on rapid and accurate identification of *Nocardia* species. In this context, molecular methods for identification, such as MLSA analysis offers a time-saving alternative to conventional methods for identifying *Nocardia* genus to the species level, including in Brazil.

Acknowledgements

This work was supported by This work was supported by CAPES, FAPERJ, CNPq, PAPES V- FIOCRUZ/ CNPq, SR-2/UERJ, and the Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD - CAPES/MEC).

Disclosure statement

No competing financial interests exist.

References

1. Ribeiro MG, Salerno T, Mattos-Guaraldi AL, Camello TC, Langoni H, Siqueira AK, Paes AC, Fernandes MC, Lara GH (2008) Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 177-185.
2. Conville PS, Witebsky F (2011) *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and Other Aerobic Actinomycetes. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th. Ed. ASM Press, Washington. D. C.

3. Condas LAZ, Ribeiro MG, Gono T, Matsuzawa T, Yazawa K, Motta RG, Franco MMJ, Listoni FJP (2012) Molecular identification and thermoresistance to boiling of *Nocardia Farcinica* and *Nocardia Cyriacigeorgica* from bovine bulk tank milk. *Brazilian J Microbiol* 43: 1038-1041.
4. Euzéby JP (2013) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. (<http://www.bacterio.cict.fr/>).
5. Clark NM, AST Infectious Diseases Community of Practice (2009) *Nocardia* in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant* 9 (Suppl 4): S70– S77
6. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J (2010) Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection* 38: 89-97.
7. Bibi S, Irfan S, Zafar A, Khan E (2012) Isolation frequency and susceptibility patterns of *Nocardia* species at a tertiary hospital laboratory in Karachi, Pakistan. *J Infect Dev Ctries* 5: 499-501.
8. Al-Jahdali H, Baharoon S, Alothman S, Memish Z, Waness A (2011) Nocardiosis in a Tertiary Care Hospital in Saudi Arabia. *J Glob Infect Dis* 3: 128–132.
9. Hardak E, Yigla M, Berger G, Sprecher H, Oren I (2012) Clinical spectrum and outcome of *Nocardia* infection: experience of 15-year period from a single tertiary medical center. *Am J Med Sci* 343: 286-90.
10. Wallace RJ Jr, Steele LC, Sumter G, Smith JM (1988) Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1776-1779.
11. Wilson JW (2012) Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clin Proc.* 87: 403-7.
12. Conville PS, Witebsky FG (2007) Organisms designated as *Nocardia asteroides* drug pattern type VI are members of the species *Nocardia cyriacigeorgica*. *J Clin Microbiol* 45: 2257-2259.
13. Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E, Muñoz P(2009) Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine (Baltimore)* 88: 250-261.

14. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX (2010) Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 48: 4525-4533.
15. Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, Chen X, Chen SC (2010) secA1 gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity. *J Clin Microbiol* 48: 3928-3934.
16. Chen YC, Lee CH, Chien CC, Chao TL, Lin WC, Liu JW (2012) Pulmonary nocardiosis in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infec* 24 pii: S1684-1182(12)00161-2. doi: 10.1016/j.jmii.2012.07.017. [Epub ahead of print]
17. Tan CK, Lai CC, Lin SH, Liao CH, Chou CH, Hsu HL, Huang YT, Hsueh PR (2010) Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998-2008. *Clin Microbiol Infect* 16 966-72.
18. Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ (2002) Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. *J Clin Microbiol* 40: 1346-1351.
19. Brown JM, McNeil MM (2003) *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes, p. 370–398. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
20. Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H (2003) Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J Clin Microbiol* 41: 851-6.
21. Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M, Delmeé M (2005) Distribution of nocardia species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J Clin Microbiol* 43: 2624-8.
22. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr (2006) Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 19: 259-282.
23. CLSI Clinical Laboratory Standards Institute (2007) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. M45-A, CLSI, Wayne, 15 pp.
24. Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TC, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL (2013) Clonal multidrug-

resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 23-29.

25. Conville PS, Zelany AM, Witebsky FG (2006) Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 44: 2760-2766.

26. Yin X, Liang S, Sun X, Luo S, Wang Z, Li R (2007) Ocular Nocardiosis: *hsp65* Gene Sequencing for Species Identification of *Nocardia* spp. *American J Ophthalmology* 144: 570-573.

27. Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y (2010) Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *J Med Microbiol* 59: 165-171.

28. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

29. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

30. Blümel J, Blümel E, Yassin AF, Schmidt-Rotte H, Schaal KP (1998) Typing of *Nocardia farcinica* by pulsed-field gel electrophoresis reveals an endemic strain as source of hospital infections. *J Clin Microbiol* 36: 118-22.

31. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33 :2233-2239.

32. Agterof MJ, van der Bruggen T, Tersmette M, ter Borg EJ, van den Bosch JM, Biesma DH (2007) Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. *Neth J Med* 65: 199-202.

33. Alnaum HM, Elhassan MM, Mustafa FY, Hamid ME (2011) Prevalence of *Nocardia* species among HIV-positive patients with suspected tuberculosis. *Trop Doct* 41: 224-226.

34. Peleg AY, Husain S, Qureshi ZA, Silveira FP, Sarumi M, Shutt KA, Kwak EJ, Paterson DL (2007) Risk factors, clinical characteristics, and outcome of *Nocardia* infection in organ transplant recipients: a matched case-control study. *Clin Infect Dis* 44: 1307-1314.

35. Sullivan DC, Chapman SW (2010) Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis/nocardia. *Proc Am Thorac Soc* 7: 216-221.

36. Savini V, Fazio P, Favaro M, Astolfi D, Polilli E, Pompilio A, Vannucci M, D'Amario C, Di Bonaventura G, Fontana C, D'Antonio D (2012) Tuberculosis-like pneumonias by the aerobic actinomycetes *Rhodococcus*, *Tsukamurella* and *Gordonia*. *Microbes Infect* 14: 401-410.
37. Liu WL, Lai CC, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YL, Huang YT, Hsueh PR (2011) Clinical and microbiological characteristics of infections caused by various *Nocardia* species in Taiwan: a multicenter study from 1998 to 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1341-1347.
38. Conville PS, Witebsky FG (2005) Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *J Clin Microbiol* 43: 2881-2885.
39. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3: 733-739.
40. Tamura T, Matsuzawa T, Oji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Katsumata H, Yamazoe A, Hamada M, Suzuki K, Gono T, Fujita N (2012) A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102: 481-491.
41. Chedid MB, Chedid MF, Porto NS, Severo CB, Severo LC (2007) Nocardial infections: report of 22 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49: 239-246.
42. Santamaria Saber LT, Figueiredo JF, Santos SB, Levy CE, Reis MA, Ferraz AS (1993) *Nocardia* infection in renal transplant recipient: diagnostic and therapeutic considerations. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 35: 417-21.
43. Kanne JP, Yandow DR, Mohammed TL, Meyer CA. CT findings of pulmonary nocardiosis (2011) *AJR Am J Roentgenol* 197: W266-W272.
44. Yu X, Han F, Wu J, He Q, Peng W, Wang Y, Huang H, Li H, Wang R, Chen J (2011) *Nocardia* infection in kidney transplant recipients: case report and analysis of 66 published cases. *Transpl Infect Dis* 13: 385-391.
45. Batista MV, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girão ES, Rosa DR, Ianhez LE, Bonazzi PR, Lima AS, Fernandes PF, Pádua-Neto MV, Bacchella T, Oliveira AP, Viana CF, Ferreira MS, Shikanai-Yasuda MA (2011) Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Trop Med Int Health* 16: 1134-1142.

46. Santos M, Gil-Brusola A, Morale P (2011) Infection by *Nocardia* in solid organ transplantation: thirty years of experience. *Transplant Proc* 43: 2141-2144.
47. Rasheed MU, Belay G (2008) Nocardiosis in HIV seropositive clinically suspected pulmonary tuberculosis patients. *Trop Doct* 38: 34-35.
48. Nwuba CO, Kogo G, Ogbu N, Abolarin O, Okonkwo R (2012) Nocardiosis - an emerging complication in the clinical management of HIV infected patients. *Retrovirology* 9(Suppl 1):P134. <http://www.retrovirology.com/content/9/S1/P134>.
49. Baily GG, Neill P, Robertson VJ (1988) Nocardiosis: a neglected chronic lung disease in Africa? *Thorax* 43: 905-910.
50. Poonwan N, Kusum M, Mikami Y, Yazawa K, Tanaka Y, Gono T, Hasegawa S, Konyama K (1995) Pathogenic *Nocardia* isolated from clinical specimens including those of AIDS patients in Thailand. *Eur J Epidemiol* 11: 507-512.
51. Ba-Fall KM, Mbaye MN, Niang AR, Faye ME, Fall K, Fall B, Bâ PS, Soko TO, Mbaye PS (2011) [Nocardiosis: 4 cases in Senegal]. *Med Trop (Mars)* 71: 613-614.
52. Jacomelli M, Silva PR, Rodrigues AJ, Demarzo SE, Seicento M, Figueiredo VR (2012) Bronchoscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with negative sputum smear microscopy results. *J Bras Pneumol* 38: 167-173.
53. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil (2012) Especial Tuberculose 43
portal.saude.gov.br/portal/arquivos/.../bolepi_v43_especial_tb_correto.p...
54. Piller, RVB (2012) Epidemiologia da Tuberculose. *Pulmão* 121:4-9.
www.sopterj.com.br/revista/2012_21_1/02.pdf.
55. Lago R F, Costa NR (2010) Policy dilemmas in providing antiretroviral treatment in Brazil. *Ciênc Saúde Coletiva* 15 supl 3: 3529-3540. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000900028>
56. Nunn, AS, Fonseca EM, Bastos FI, Gruskin S, Salomon JA (2011) Evolution of antiretroviral drug costs in Brazil. In the context of free and universal access to Aids treatment. www.Plosmedicine.Org/.../Journal.Pmed.0040305.
57. Budzik JM, Hosseini M, Mackinnon AC Jr, Taxy JB (2012) Disseminated *Nocardia farcinica*: literature review and fatal outcome in an immunocompetent patient. *Surg Infect (Larchmt)* 13: 163-170.

58. Vuotto F, Faure K, Queyre V, Dessein R, Pasquet A, Lambert M, Haulon S, Beregi J, Guery B, Hatron P (2011) Vascular nosocomial *Nocardia farcinica* infection after arterial stenting in an immunocompetent patient. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 22: e10-11.
59. Hong SB, Han K, Son BR, Shin KS, Rim BC (2012) First case of *Nocardia nova* spinal abscess in an immunocompetent patient. *Braz J Infect Dis* 16:196-199.
60. Lin CC, Lalitha P, Srinivasan M, Prajna NV, McLeod SD, Acharya NR, Lietman TM, Porco TC (2012) Seasonal trends of microbial keratitis in South India. *Cornea* 31:1123-1127.
61. Mascarenhas J, Srinivasan M, Chen M, Rajaraman R, Ravindran M, Lalitha P, Oldenburg CE, Ray KJ, Glidden DV, Costanza S, Lietman TM, Acharya NR (2012) Differentiation of etiologic agents of bacterial keratitis from presentation characteristics. *Int Ophthalmol* 32: 531-538.
62. Nascimento EG, Carvalho MJ, de Freitas D, Campos M (1995) Nocardial keratitis following myopic keratomileusis. *J Refract Surg* 11: 210-211.
63. Urbano AP, Urbano AP, Torigoe AMS, Urbano I, Kara-José N (2003) Spontaneous nocardial scleritis: case report. *Arq Bras Oftalmol* 66: 223-225.
64. Hofling-Lima AL, Branco BC, Romano AC, Campos MQ, Moreira H, Miranda D, Kwitko S, de Freitas D, Casanova FH, Sartori M, Schor P, Souza LB (2004) Corneal infections after implantation of intracorneal ring segments. *Cornea* 23: 547-9.
65. Ramos-Esteban JC, Servat JJ, Silva RS, Ambrósio R Jr, Tauber S, Bia F (2007) Necrotizing nocardial scleritis after combined penetrating keratoplasty and phacoemulsification with intraocular lens implantation: a case report and review of the literature. *Arq Bras Oftalmol* 70: 355-359.
66. Londero AT, Ramos CD, Matte SW (1986) Actinomycotic mycetomas in Rio Grande do Sul - report of 4 cases *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 73-7.
67. Castro LG, Belda Júnior W, Salebian A, Cucé LC (1993) Mycetoma: a retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989. *Mycoses* 36: 89-95.
68. Saraça GD, Towersey L, Hay RJ, Londero AT, Martins Ede C, Amora AT, Reis KM, Mendonça AM, Estrella RR (1993) Mycetoma by *Nocardia asteroides*: a 9 year follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35: 199-204.
69. Lopes JO, Bassanesi MC, Alves SH, Salla A, Benevenga JP, Castro MS (1994) Cutaneous *Nocardia asteroides* infection of nontraumatic origin. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36: 403-408.

70. Lopes JO, Silva CB, Kmohan C, Oliveira LT, Dal Forno NL, Pereira CC (1995) Acute primary cutaneous *Nocardia asteroides* infection in a patient with systemic lupus erythematosus. Case report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 37: 547-50.
71. Motta RL, Vilela RV, Lambertucci JR (2004) Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. Rev Soc Bras Med Trop 37: 287-288.
72. Castro LG, Piquero-Casals J (2008) Clinical and mycologic findings and therapeutic outcome of 27 mycetoma patients from São Paulo, Brazil. Int J Dermatol 47: 160-163.
73. Dresch TFLR, Magalhães TC, Piñeiro-Maceira J, Akiti T, Ramos-e-Silva M (2010) Combined Therapy for Mycetoma: Medical and Surgical Dermatologic. Surgery 36: 952–954.
74. Magalhães GM, Oliveira SC, Soares AC, Machado-Pinto J, de Resende MA (2010) Mycetoma caused by *Nocardia caviae* in the first Brazilian patient. Int J Dermatol 49: 56-58.
75. Cordeiro F, Bruno C, Reis C (2011) Mycetoma. Am J Trop Med Hyg 85: 791.
76. Brown-Elliott BA, Biehle J, Conville PS, Cohen S, Saubolle M, Sussland D, Wengenack N, Kriel K, Bridge L, McNulty S, Vasireddy R, Wallace RJ Jr (2012) Sulfonamide resistance in isolates of *Nocardia* spp. from a US multicenter survey. J Clin Microbiol 50: 670-672.
77. Uhde KB, Pathak S, McCullum I Jr, Jannat-Khah DP, Shadomy SV, Dykewicz CA, Clark TA, Smith TL, Brown JM (2010) Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995-2004. Clin Infect Dis 51: 1445-1448.
78. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pépin J (2011) Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988-2008. Clin Microbiol Infect 17: 690-696.
79. No authors listed (2012) *Nocardia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole? Maybe not. Clin Infect Dis 55: iii-iv.
80. Brown BA, Lopes JO, Wilson RW, Costa JM, de Vargas AC, Alves SH, Klock C, Onyi GO, Wallace RJ Jr (1999) Disseminated *Nocardia pseudobrasiliensis* infection in a patient with AIDS in Brazil. Clin Infect Dis 28: 144-145.
81. Severo CB, Oliveira FM, Cunha L, Cantarelli V, Severo LC (2005) Disseminated nocardiosis due to *Nocardia farcinica*: diagnosis by thyroid abscess culture. Rev Inst Med Trop S Paulo 47: 355-358
82. Bonnet F, Donay JL, Fieux F, Marie O, de Kerviler E, Jacob L (2007) Postoperative nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum*: pitfalls and delayed diagnosis Ann Fr Anesth Reanim 26: 680-684.

83. Petrillo VF, Severo LC, Londero AT, Porto NS (1978) Pulmonary nocardiosis report of the first two Brazilian cases. *Mycopathologia* 66: 17-20.
84. Livramento JA, Machado LR, Spina-França (1989) Anormalidades do líquido cefalorraqueano em 170 casos de AIDS. *Arq Neuro-Psiquiatr* 47: 326-331.
85. Coelho Filho JC (1990) Pulmonary cavities colonized by actinomycetes: report of six cases. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 32: 63-66.
86. Lopes JO, Alves SH, Benevenga JP, Salla A, Tatsch I (1993) *Nocardia asteroides* peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35: 377-379.
87. Aguiar PHP, Pahl FH, Uip DE, Vellutini EAS, Mutarelli EG, Taricco MA, Gomes MQT, Loreto CDL (1995) Abscesso cerebelar por *Nocardia*: relato de caso. *Arq Neuro-Psiquiatr* 53: 307-311.
88. Machado CM, Macedo MC, Castelli JB, Ostronoff M, Silva AC, Zambon E, Massumoto C, Chamone DF, Dulley FL (1997) Clinical features and successful recovery from disseminated nocardiosis after BMT. *Bone Marrow Transplant* 19: 81-82.
89. Camargo LACR, Silva Junior EF, Lapchik MS, Di Loreto C (1997) Pulmonary nocardiosis: presentation of a clinical case with poor evolution. *J Pneumol* 23: 211-214.
90. Barata CH, Oliveira DA, Colombo AL, Pereira CA (2000) Brain abscess caused by *Nocardia* sp in immunosuppressed patient. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 609-612.
91. Silva ACG, Martins, EML, Marchiori E, Torres Neto G (2002) Nocardiose pulmonar em paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida: relato de caso. *Radiol Bras* 35: 235-238.
92. Faucz RA, Quadros MS, Andrade CA, Troncoso FT, Ribeiro Filho NF, Furtado JD, Souza RP (2006) Triple pulmonary infection in a severely immunocompromised AIDS patient: a case report. *Radiol Bras* 39: 79-82.
93. Baldi BG, Santana AN, Takagaki TY (2006) Pulmonary and cutaneous nocardiosis in a patient treated with corticosteroids. *J Bras Pneumol* 32: 592-595.
94. Brasileiro RMF, Pinho ACCA, Medeiros CS, Ferri F, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Buzzoleti FC (2007) Pulmonary nocardiosis in a patient who was a chronic corticosteroid user. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 585-587.

95. Aidê MA, Lourenço SS, Marchiori E, Zanetti G, Mondino PJJ (2008) Nocardiose pulmonar em portador de doença pulmonar obstrutiva crônica e bronquiectasias. *J Bras Pneumol* 34: 985-988.
96. Moraes PRS, Chimara E, Telles MAS, Ueki SYM, Cunha EAT, Honer MR, Leão SC (2008) Identification of non-tuberculous mycobacteria from the Central Public Health Laboratory from Mato Grosso do Sul and analysis of clinical relevance. *Braz J Microbiol* 39: 268-272.
97. Sarcinelli-Luz B, Marchiori E, Zanetti G, Mano CM, Abdalla F, Carvalho JF, Assed C, Santos IG (2009) Pulmonary nocardiosis in the acquired immunodeficiency syndrome, computed tomographic findings: a case report. *Cases J* 15: 6642.
98. Rêgo RSM, Silveira NSS, Lima KM, Melo FM (2009) Disseminated nocardiosis in leucemic patient. *Rev Bras Anal Clin* 41: 51-53.
99. Castelli JB, Siciliano RF, Abdala E, Aiello VD (2011) Infectious endocarditis caused by *Nocardia* sp.: histological morphology as a guide for the specific diagnosis. *Braz J Infect Dis* 15: 384-386.

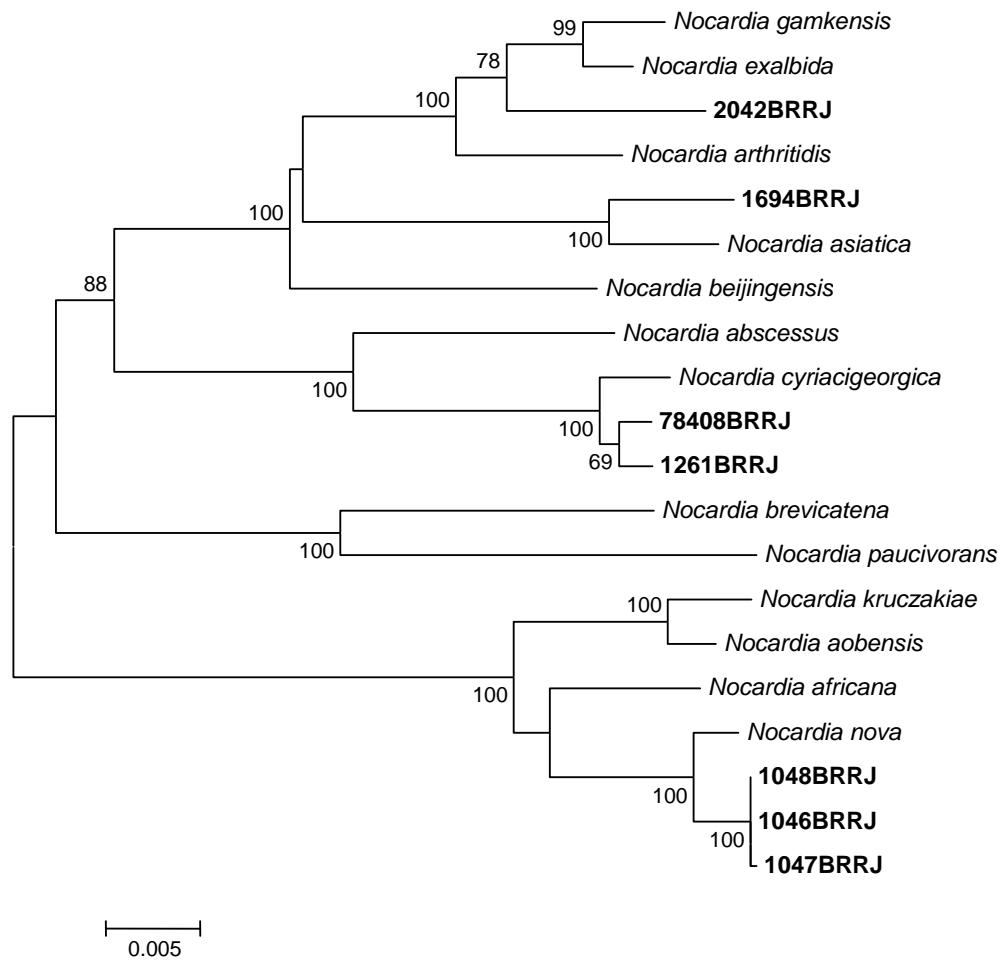


Figure 1. An NJ tree constructed from the 3,189-bp concatenated *gyrB*-16S-*secA*-*hsp65*-sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown.

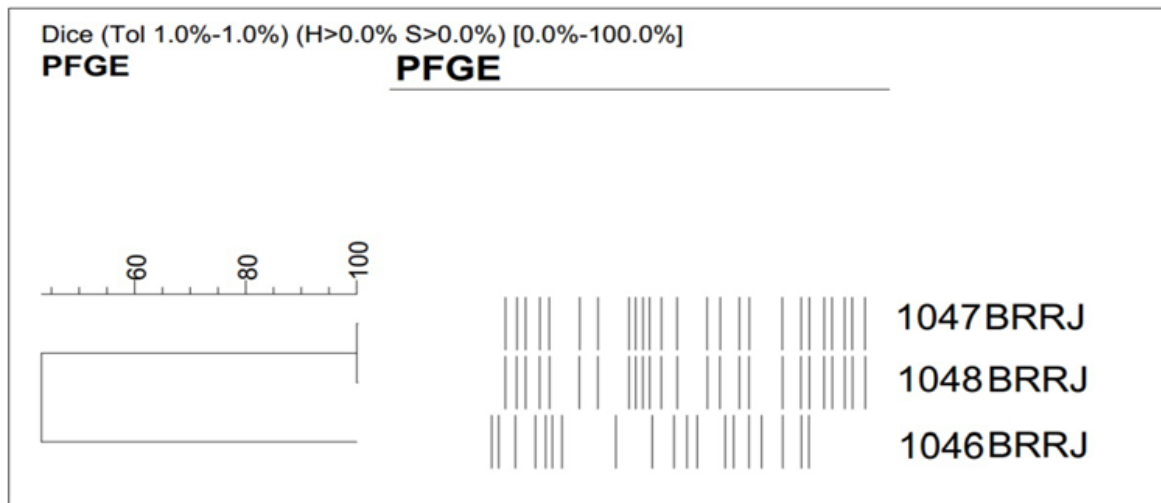


Figure 2. Dendrogram displaying PFGE profiles of *Nocardia nova* strains.

Table 1. Antimicrobial susceptibility profiles, clinical sites and phenotypic and molecular identification of seven *Nocardia* strains isolated from humans, Brazil

Strain	Clinical site	Antimicrobial profiles ^a									Phenotypic identification	MLSA identification
		AMK	GEN	TOB	ERY	CIP	AMP	AMX	IMP	TMP+SMX		
1046BRRJ *	BAL ^b	S ^d	S	R	S	R ^e	# ^c	#	S	S	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>
1047BRRJ *	Nodule secretion	S	S	R	S	R	#	#	S	S	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>
1048BRRJ *	Tracheal aspirate	S	S	R	S	R	#	#	S	S	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>
1261BRRJ	Pulmonary fragment	S	S	S	R	R	#	#	S	S	<i>N. cyriacigeorgica</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
1694BRRJ	Cerebral abscess	S	S	S	R	R	S	#	S	S	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. asiática</i>
2042BRRJ	BAL	S	S	S	S	S	R	R	S	S	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. gamkensis/exalbida</i>
78408BRRJ	#	S	S	S	R	R	#	#	S	S	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>

^a AMK, amikacin; AMX, amoxicillin; AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; IMP, imipinen; TOB, tobramycin; TMP+SMX, trimethoprim + sulfamethoxazole; ^b BAL - bronchoalveolar lavage fluid; ^c # Unknown; ^d S – sensitive; ^e R – resistant; Clinical isolates obtained from only one patient.

Table 2. Similarity values of the 16S rRNA, *secA1*, *hsp65* and *gyrB* gene sequences of seven Brazilian *Nocardia* strains compared with *Nocardia* type strains and identification by conventional biochemical tests and molecular diagnosis using multilocus sequence analysis (MLSA)

Strain	16S rRNA similarity (%)	pb	<i>secA1</i> similarity (%)	pb	<i>hsp65</i> similarity (%)	pb	<i>gyrB</i> similarity (%)	pb	Phenotypic identification	MLSA identification
1046BRRJ	99.52 <i>N. nova</i> 99.07 <i>N. jiangxiensis</i>	1487	99.36 <i>N. nova</i> 98.72 <i>N. elegans</i>	478	99.76 <i>N. nova</i>	418	99.14 <i>N. nova</i> 97.90 <i>N. elegans</i> 89.59 <i>N. jiangxiensis</i>	1050	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>
1047BRRJ	99.52 <i>N. nova</i> 99.08 <i>N. jiangxiensis</i>	1487	99.36 <i>N. nova</i> 98.72 <i>N. elegans</i>	497	99.76 <i>N. nova</i>	420	98.80 <i>N. nova</i> 97.50 <i>N. elegans</i> 89.39 <i>N. jiangxiensis</i>	1001	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>
1048BRRJ	99.53 <i>N. nova</i> 99.07 <i>N. jiangxiensis</i>	1500	99.36 <i>N. nova</i> 98.72 <i>N. elegans</i>	491	99.75 <i>N. nova</i>	418	99.10 <i>N. nova</i> 97.80 <i>N. elegans</i> 89.72 <i>N. jiangxiensis</i>	1004	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>
1261BRRJ	100,0 <i>N. cyriaciageorgica</i> 98.90 <i>N. abscessus</i>	1489	100,0 <i>N. cyriaciageorgica</i> 94.25 <i>N. pneumoniae</i> 93.33 <i>N. abscessus</i>	510	100,0 <i>N. cyriaciageorgica</i> 97.51 <i>N. abscessus</i>	413	100,0 <i>N. cyriaciageorgica</i> 97.51 <i>N. abscessus</i>	1052	<i>N. cyriaciageorgica</i>	<i>N. cyriaciageorgica</i>
1694BRRJ	99.85 <i>N. asiatica</i> 99.04 <i>N. abscessus</i> 98.99 <i>N. arthritis</i>	1487	99.78 <i>N. asiatica</i> 99.36 <i>N. abscessus</i> 95.11 <i>N. arthritis</i>	500	100.00 <i>N. asiatica</i> 98.78 <i>N. abscessus</i> 96.76 <i>N. arthritis</i>	415	95.60 <i>N. asiatica</i> 95.02 <i>N. arthritis</i> 92.74 <i>N. abscessus</i>	1053	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. asiatica</i>
2042BRRJ	99.51 <i>N. exalbida</i> 99.23 <i>N. gankensis</i> 99.00 <i>N. arthritis</i>	1499	99.36 <i>N. arthritis</i> 99.33 <i>N. gankensis</i> 99.15 <i>N. exalbida</i>	493	98.75 <i>N. gankensis</i> 98.50 <i>N. arthritis</i> 98.25 <i>N. exalbida</i>	420	96.38 <i>N. exalbida</i> 96.17 <i>N. gankensis</i> 94.63 <i>N. arthritis</i>	1000	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia exalbida/gankensis</i>
78408BRRJ	99.93 <i>N. cyriaciageorgica</i> 98.90 <i>N. abscessus</i>	1500	98.93 <i>N. cyriaciageorgica</i> 93.55 <i>N. abscessus</i>	495	99.52 <i>N. cyriaciageorgica</i> 97.01 <i>N. abscessus</i>	419	98.09 <i>N. cyriaciageorgica</i> 96.28 <i>N. abscessus</i>	1102	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	<i>N. cyriaciageorgica</i>

Table 3. Previous studies of nocardiosis in Brazil from 1970 to 2013

City/State (Year) ^{References}	Nocardiosis disease (number of cases)	Underlying conditions or associated conditions of immunosuppression (number of cases)	Identification	Therapy ^a	Outcome
Porto Alegre/ RS (1978) ^[83]	Pulmonary (2)	Tobacco smoking (1); Neoplastic disease, corticotherapy (1)	<i>N. asteroides</i> ; <i>N. asteroides</i>	SUF, CS; SUF	Cure (1); Death (1)
São Paulo/ SP (1989) ^[84]	Cerebrospinal fluid (1)	HIV infection	<i>Nocardia</i> sp.	-	-
Salvador/ BA (1990) ^[85]	Pulmonary (6)	Not identified	<i>Nocardia</i> sp.	-	-
Ribeirão Preto/ SP [1993 (1968-1991)] ^[42]	Pulmonary (6); Disseminated (3)	Renal transplant, corticotherapy (9)	<i>Nocardia</i> sp. (3); <i>N. asteroides</i> (5); <i>N. brasiliensis</i> (1)	TMP+SMX (associations)	Death (7); Cure (2)
Santa Maria/ RS (1993) ^[86]	Peritonitis (1)	Systemic lupus erythematosus and failure renal, ambulatory peritoneal dialysis	<i>N. asteroides</i>	CET/TMP+SMX	Cure
São Paulo/ SP (1995) ^[87]	Cerebelar abscessus and pulmonary (1)	HIV infection	<i>N. asteroides</i>	CTR	Death
São Paulo/ SP (1995) ^[62]	Keratitis (1)	Myopic keratomileusis	<i>N. asteroides</i>	-	Visual debilitating sequelae
São Paulo/ SP (1997) ^[88]	Disseminated (1)	Bone marrow transplant	<i>Nocardia</i> sp.	TMP+SMX	Cure
São Paulo/ SP (1997) ^[89]	Pulmonary (1)	Alcoholism, tobacco smoking, COPD ^d	<i>Nocardia</i> sp.	TMP+SMX, CTR, CM	Death
Santa Maria/ RS (1999) ^[80]	Disseminated (1)	HIV infection	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	AMB/ CM, AMK /IMP, TMP+SMX	Death
Uberaba/ MG (2000) ^[90]	Brain abscessus and disseminated (1)	Autoimmune haemolytic anaemia and thrombocytopenic purpura (Evans Syndrome), corticotherapy	<i>Nocardia</i> sp.	CM, CFPM VAN/IMP, CIL, AMB/ AZ, TMP+SMX	Cure

Niterói/ RJ (2002) ^[91]	Pulmonary (1)	HIV infection, healed tuberculosis	<i>Nocardia</i> sp.	TMP+SMX	Death
Campinas/ SP (2003) ^[63]	Scleritis (1)	None	<i>N. asteroides</i>	TMP+SMX and AMK eyedrops	Visual debilitating sequelae Cure;
São Paulo/ SP (2004) ^[64]	Keratitis (1)	Implantation of intracorneal rings segments – IRS	<i>Nocardia</i> sp.	-	No remotion of IRS
Porto Alegre/ RS (2005) ^[81]	Disseminated and thyroid abscessus (1)	Corticotherapy	<i>N. farcinica</i>	TMP+SMX	Death
São Paulo/ SP (2006) ^[92]	Pulmonary (1) ^a	HIV infection	<i>Nocardia</i> sp.	AMB/ TMP+SMX	Death
São Paulo/ SP (2006) ^[93]	Pulmonary and cutaneous (1)	Bronchiolitis obliterans, corticotherapy	<i>N. asteroides</i>	TMP+SMX	Cure
Niterói/ RJ (2007) ^[65]	Scleritis (1)	Keratoplasty and intraocular lens implantation		TMP+SMX, AMK eyedrops	
	Pulmonary (14)	COPD (3), systemic lupus erythematosus (1), HIV infection (1), neoplastic disease (4), corticotherapy (10), radiotherapy (4), chemotherapy (6), liver transplant (1), kidney transplant (2), asthma (1), chronic bronchitis (1)	<i>N. asteroides</i> complex (4); <i>N. asteroides</i> (1); <i>Nocardia</i> sp.(9)	TMP+SMX	Cure (6); Death (8);
Porto Alegre/ RS (2007) ^[41]	Pulmonary and cutaneous (1)	Not identified	<i>Nocardia</i> sp. (1)	TMP+SMX	Death (1);
	Disseminated (4)	COPD (1), diabetes (1), corticotherapy (3), neoplastic disease (1), chemotherapy (2), radiotherapy (1), liver transplant (1), not identified (1)	<i>Nocardia</i> sp. (4)	IMP+ VAN/ SUF +AMK/ TMP+SMX	Death (2); Cure (2)
São Paulo/ SP (2007) ^[94]	Pulmonary (1)	Idiopathic thrombocytopenic purpura, corticotherapy	<i>N. farcinica</i>	TMP+SMX	Death
Niterói/ RJ (2008) ^[95]	Pulmonary (1)	COPD, bronchiectasis, corticotherapy	<i>Nocardia</i> sp.	AMK , IMP,CIL/ TMP+SMX	Cure

Campo Grande/ MS (2008) ^[96]	Pulmonary (1)	Not identified	<i>Nocardia brasiliensis.</i>	-	-
Niterói/ RJ (2009) ^[97]	Pulmonar nocardiosis (1)	HIV infection	<i>Nocardia spp.</i>	Antiretroviral drugs TMP+SMX	Cure
Niterói/ RJ (2009) ^[98]	Pulmonary abscesso (1)	Chronic lymphocytic leukemia	<i>Nocardia brasiliensis</i>	TMP+SMX	Cure
São Paulo/ SP (2011) ^[99]	Endocarditis (1)	Liver transplant, corticotherapy	<i>Nocardia sp.</i>	CSP, AZ/ IMP, AMK, TMP+SMX	Cure
São Paulo/ SP (BH/Fortaleza/ Uberlândia) (2011) ^[45]	Disseminated (1)	Kidney transplant	<i>Nocardia sp.</i>	TMP+SMX	Cure
São Paulo/ SP (2012) ^[52]	Pneumocystis, fungal infections or nocardiosis ^b (20)	Not identified	<i>Nocardia sp.</i>	Not identified	Not identified

^a AMB, amphotericin B; AMK, amikacin; AZ, azathioprine, CET, cephalothin; CFPM, cefepime; CIL, cilastatin; CM, clindamycin; CS, cycloserine; CSP, cyclosporine; CTR, ceftriaxona; IMP, imipinen; SUF, sulfadiazine; TMP+SMX, trimethoprim + sulfamethoxazole; VAN, vancomycin

^b Coinfection with *M. tuberculosis* and *Aspergillus sp.*

^c Bronchoscopy * diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with negative sputum smear microscopy results

^d COPD Chronic obstructive pulmonary disease.

3.3 Artigo científico - Irregular Gram positive rods and aerobic actinomycetes isolated from clean room environments.

Irregular Gram positive rods and aerobic actinomycetes isolated from clean room environments

Autores: Paulo Victor Pereira Baio, Koko Otsuki, Carmen Lucia Rocha, João Flávio Carneiro Veras, Juliana Nunes Ramos, Livia Maria Rubem Vidal, Vanda Maria Morgado Alves, Raphael Hirata Júnior, Ana Luiza Mattos-Guaraldi; Verônica Viana Vieira.

Revista: (Em fase final de redação)

RESUMO

A carga bacteriana do ar em salas limpas são rotineiramente monitorados. No entanto, uma proporção substancial de bactérias isoladas nesse ambiente são difíceis de identificar por procedimentos microbiológicos padrões. Neste estudo, um total de 48 cepas de bastonetes Gram positivos irregulares (BGPIs) e actinomicetos aeróbios isolados de ambientes de salas limpas foram submetidos a análise da sequência do gene 16S rRNA. A análise de sequências dos genes housekeeping para os gêneros mais comumente encontrados neste estudo (*Microbacterium*, *Streptomyces* e *Corynebacterium*) também foi realizado: utilizamos a análise da sequência multilocus (MLSA) para cepas de *Streptomyces*, a sequência dos genes *rpoB* e *recA* para cepas de *Microbacterium* e a sequência do gene *rpoB* para cepas de *Corynebacterium*. A análise da sequência do gene 16S rRNA foi eficaz para a identificação dos BGPIs e actinomicetos aeróbicos, que não foram identificados por métodos fenotípicos: 95,83% e 35,42% a nível de gênero e a níveis de espécies, respectivamente. Três cepas de *Microbacterium* foram identificadas ao nível da espécie pela análise da sequência de genes *rpoB* e *recA*. Duas cepas de *Corynebacterium* foram identificadas ao nível de espécie pela análise da sequência do gene *rpoB*. Os fragmentos da sequência de cinco genes housekeeping: *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* contribuíram para a identificação

ao nível de espécie de uma única cepa de *Streptomyces*. Além disso, algumas bactérias isoladas de ambientes de sala limpa exibiu > 99% de similaridade com a sequência do gene 16S rRNA com micro-organismos que resistem a ambientes inóspitos. Em conclusão, uma ampla diversidade de BGPIs e actinomicetos aeróbicos de vários gêneros foram detectados em sala limpa. Estes micro-organismos podem ser um risco considerável de contaminação das áreas de produção de produtos farmacêuticos. Métodos moleculares podem contribuir para o controle de contaminação microbiana na indústria farmacêutica.

TITLE PAGE**Irregular Gram positive rods and aerobic actinomycetes isolated from clean room environment: housekeeping genes sequences analysis**

Paulo Victor Pereira Baio^{1,2,4}, Koko Otsuki³, Carmen Lucia Rocha², João Flávio Carneiro Veras², Juliana Nunes Ramos^{1,2}, Livia Maria Rubem Vidal², Vanda Maria Morgado Alves², Raphael Hirata Júnior¹, Ana Luiza Mattos-Guaraldi¹; Verônica Viana Vieira²

¹ Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance - LDCIC. Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

² National Institute for Quality Control in Health (INCQS). Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

³ Institute Oswaldo Cruz (IOC). Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

⁴ Laboratório Químico e Farmacêutico do Exército, LQFEx, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;\

Running title: IGPRs and aerobic actinomycetes in clean rooms

Key words: Irregular Gram-positive rods; aerobic Actinomycetes; bacterial identification; clean room; 16S rRNA gene; MLSA

✉***Mailing address and contact:** Dr Verônica Viana Vieira. Departamento de Microbiologia. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Avenida Brasil. 4365; Phone number: +55 (21) 3865-5186; Fax number: +55 (21) 2290-0915; E-mail: veronica.vieira@incqs.fiocruz.br

Abstract

The bacterial loads of air in pharmaceutical clean rooms are routinely monitored. However, a substantial proportion of bacteria isolated from clean rooms are difficult to identify by standard microbiological procedures. In this study, a total of 48 strains of Irregular Gram-positive rods (IGPRs) and aerobic actinomycetes isolated from clean room environments were submitted to 16S rRNA gene sequence analysis. Sequences analysis of the housekeeping genes for the most commonly genera found in this study (*Microbacterium*, *Streptomyces* and *Corynebacterium*) was also carried out: multilocus sequence analysis (MLSA) to *Streptomyces* isolates, *rpoB* and *recA* genes for *Microbacterium* isolates and *rpoB* gene sequence analysis to *Corynebacterium* strains. The 16S rRNA gene sequence analysis was effective for identifying IRGPRs and aerobic actinomycetes that were not identified by the phenotypic methods: 95.83 % and 35.42% at genus and species levels, respectively. Three *Microbacterium* strains were identified to species level by sequence analysis of *rpoB* and *recA* genes. Two *Corynebacterium* strains were identified to species level by sequence analysis of *rpoB* gene. The sequence fragments of five housekeeping genes: *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *trpB* contributed to the species identification of only one *Streptomyces* strain. Moreover, some bacterial isolates from clean room environments exhibited >99% 16S rRNA sequence similarity to microorganisms that withstand inhospitable environments. In conclusion, a broad diversity of IGPRs and aerobic actinomycetes from several genera were detected in clean room. These microorganisms could be a considerable risk for contamination of pharmaceutical manufacturing areas. Molecular methods may contribute to the control of microbial contamination in the pharmaceutical industry.

Introduction

Clean rooms are considered to be extreme environments created by highly selective conditions, in which the air quality, temperature and humidity are highly regulated in order to have a low level of pollutants such as dust, chemical vapors, aerosol particles and airborne microbes (Ventakeswaran *et al.*, 2001; La Duc *et al.*, 2007). Many products require a high level of cleanliness in the manufacturing environment such as pharmaceutical products, among others (Whyte, 2001; La Duc *et al.*, 2007).

Several studies reported the microbial diversity of spacecraft assembly clean rooms having found numerous bacterial species including irregular Gram-positive rods (IGPRs) and actinomycetes (Venkateswaran *et al.*, 2001; La Duc *et al.*, 2004; 2007; Moissl *et al.*, 2007). However, there are a few reports of air microbial diversity in pharmaceutical production (Nagarkar *et al.*, 2001; Halls, 2004). Microorganisms found in pharmaceutical products are frequently identified to assist in product investigations (Sutton & Cundell, 2004). Identification of microbiota isolates in clean rooms may also be used to evaluate effectiveness of cleaning procedures and especially to investigate sources of contamination. Since microbial identification may be a costly and time-consuming activity, the pharmaceutical companies establish microbial identification strategies and identify only microbial isolates from environmental monitoring to support investigations related to product failure due to microbial contamination (Cundell, 2006).

Many studies describe the difficulty of identifying several bacterial clusters, such as aerobic Gram-positive rods and actinomycetes by phenotypic methods (Drancourt *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2004). The Official Compendia recommends microbial identification by genotypic methods for the *Corynebacterium* and other pleomorphic Gram-positive rods (United States Pharmacopoeia Convention,

2011). Nevertheless, genotypic methods are unfamiliar to most pharmaceutical laboratories (Sutton & Cundell, 2004).

Sequence-based identification is an alternative method of identifying bacteria that are either slowly growing or difficult to identify by biochemical profiling (Patel *et al.*, 2004). Drancourt and co-workers (2000) evaluated 16S rRNA sequencing as a means to identify a collection of isolates that were unidentifiable by phenotypic identification schemes, obtained from environmental, veterinary and clinical sources. The authors found that 10.2% of the isolates remained unidentifiable by 16S rRNA sequence analysis, which, probably, were prototype isolates of new species. These isolates were mainly originated from environmental sources.

In attempt to assure microbiological quality of pharmaceutical products, sterility testing are currently performed on substances, preparations or articles by the National Control Laboratory of the Brazilian Ministry of Health, named National Institute for Quality Control of Health - INCQS/FIOCRUZ. To avoid the hazard of microbial contamination, sterility testing is carried out under aseptic conditions in clean rooms (United States Pharmacopoeia Convention, 2011). Similar to observations in spacecraft assembly clean rooms (Venkateswaran *et al.*, 2001; La Duc *et al.*, 2004; 2007; Moissl *et al.*, 2007), IGPRs and actinomycetes may be found as environmental contaminants of the clean rooms in which the sterility tests are performed at INCQS/FIOCRUZ.

In this study, IGPRs and aerobic actinomycetes strains isolated from clean room environments were submitted to 16S rRNA gene sequence analysis. Sequences analyses of the housekeeping genes for the most frequent bacterial genus that were unidentifiable by phenotypic methodology (*Microbacterium*, *Streptomyces* and *Corynebacterium*) were also carried out: multilocus sequence analysis (MLSA) to *Streptomyces* isolates,

rpoB and *recA* genes for *Microbacterium* isolates and *rpoB* gene sequence analysis to *Corynebacterium* strains.

Materials and methods

Bacterial isolates. A total 48 IGPRs and aerobic actinomycetes strains isolated from clean room environment that were previously unidentifiable by conventional biochemical methods described elsewhere and/or the API Coryne System v2.0 (BioMerieux) (Conville & Witebsky, 2011; Funke & Bernard, 2011) were evaluated in this study (**Tables 1 to 3**).

Nucleic acid extraction, gene amplification and sequencing. The 16S rRNA gene sequence analysis was performed as described by Baio and co-workers (2013). The *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *atpD* and *trpB* genes sequence analysis for *Streptomyces* strains was done as described by Guo and co-workers (2008) and the *rpoB* and *recA* genes sequence analysis for *Microbacterium* strains was achieved as described by Richert and co-workers (2007). The 16S rRNA gene sequences were compared to those available in the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST algorithm and the Ribosomal Data-base Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>). The others gene sequences were only compared in the GenBank database. The 16S rRNA sequences from all isolates have been deposited in the EMBL/GenBank database under the accession numbers presented in Table 1, 2 and 3.

Phylogenetic analysis. All gene sequences were aligned by CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997). The phylogenetic trees were constructed by using the neighbour-joining (NJ) genetic distance method and were made using the program MEGA 4.0 package with the option of complete deletion of gaps (Tamura *et al.*, 2007). The Kimura two-parameter model was chosen for all NJ tree constructions. The reliability of each tree topology was checked with 1,000 bootstrap replications.

Results

16S rRNA gene sequence analysis. Results of 16S rRNA-based identification of 24 strains isolated from clean room environment are displayed in Table 1. Eleven strains exhibited similarity $> 98.7\%$ with the 16S rRNA gene sequence of only one taxonomically described species and, therefore, it was concluded their identification to species level. For 13 strains tested, it was impossible to complete the identification to the species level since (i) eight isolates exhibited the same value of similarity ($> 98.7\%$) with different species of the genus; (ii) three isolates (3098BRRJ, 3335BRRJ and 3117BRRJ) presented similarity value between 97.0 and 98.70% with the 16S rRNA gene sequence analysis; (iii) Two isolates (3771BRRJ and 3712BRRJ) showed similarity value with the 16S rRNA gene sequence analysis less than 97% with different bacterial genera (Table 1).

In Figure 1 is presented a phylogenetic tree based on neighbor-joining method using 16S rRNA gene sequences of microorganisms displayed in Table 1. The following strains were not included in Figure 1: 3117BRRJ, 3712BRRJ and 3771BRRJ isolates because others specific studies are being conducted; 3225BRRJ and 3069BRRJ isolates belonging to *Exiguobacterium* genus and *Firmicutes* phylum and

therefore phylogenetically distant from others isolates belonging to the *Actinobacteria* phylum.

The 3299BRRJ, 3089BRRJ, 3345BRRJ, 3316BRRJ, 3361BRRJ, 3369aBRRJ, 3369bBRRJ, 3538BRRJ, 3032BRRJ, 3165BRRJ and 27302BRRJ isolates presented are closely related species indicated by sequence analysis of 16S rRNA gene as shown in Table 1. These results are supported by high bootstrap values.

The 3401BRRJ, 3097BRRJ, 3490BRRJ, 3536BRRJ and 3069BRRJ isolates were closely related by 16S rRNA gene to more than one species taxonomically described as shown in Table 1 and Figure 1. The 3335BRRJ and 3098BRRJ isolates showed isolated clusters confirming the similarity values presented in Table 1.

***rpoB* gene sequence analysis of *Corynebacterium* sp. strains.** The *rpoB* gene sequence analysis indicated four *Corynebacterium* (3345BRRJ, 3316BRRJ, 3524BRRJ and 3020BRRJ) isolates as belonging, respectively, to the species: *C. glaucum*, *C. simulans*, *C. tuberculostearicum* and *C. xerosis*.

16S rRNA, *recA* and *rpoB* gene sequence analysis gene of *Microbacterium* sp. Results of MLSA based on the *Microbacterium* spp. sequences of three housekeeping genes (16S rRNA, *recA* and *rpoB*) are displayed in Table 2. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using 16S rRNA, *recA* and *rpoB* genes sequences are displayed in Figure 2, 3 and 4, respectively.

Only five of 17 isolates identified as *Microbacterium* sp. were identified to species level by 16S rRNA gene sequence analysis (3080BRRJ, 3248BRRJ, 1942BRRJ, 3498BRRJ and 3155BRRJ). These strains had their identification concluded using the *rpoB* and *recA* genes sequence analysis as well showed high bootstrap support value in

their phylogenetic trees constructed for these genes (Figures 3 and 4). 16S rRNA, *recA* and *rpoB* gene sequence analysis allowed the identification to species level of 3016BRRJ, 3019BRRJ, and 3188BRRJ isolates (Table 2). Although the 3211BRRJ and 3249BRRJ isolates had higher similarity values with the *Microbacterium aurum* (Table 2) and they had presented cluster with this species in phylogenetic analysis (Figures 2, 3 and 4). The 3561BRRJ and 3487BRRJ isolates, presenting exceeding value of 98.70% with the 16S rRNA gene to more than one species taxonomically described (Table 2 and Figure 1). Phylogenetic analysis (Figures 2, 3 and 4) showed that for the 3487BRRJ isolate appeared a cluster with the *Microbacterium estearomaticum* type strain with high support value of bootstrap.

Microbacterium oxydans and *Microbacterium paraoxydans* species were more similar to the 3556BRRJ isolate with similarities values of 99.46% and 98.98% respectively in the 16S rRNA gene sequences analysis (Table 2). It was unable to complete the identification of this isolate by absence of *recA* and *rpoB* genes sequences for the *Microbacterium paraoxydans*. Even without these sequences deposited by phylogenetic analysis this strain was found phylogenetic distant from the *Microbacterium oxydans* specie in all constructed trees (Figure 2, 3 and 4) and probably belonged to *M. paraoxydans* species.

The 3223BRRJ, 3227BRRJ, 3408BRRJ and 3407BRRJ isolates presented similarity values below of 98.70% by the 16S rRNA gene sequence analysis with *Microbacterium* species (Table 2). Phylogenetic analysis performed for these isolates showed in all constructed trees that all of them appeared in isolated clusters with high support of bootstrap values (Figure 2, 3 and 4), except for the 3207BRRJ isolate in the 16S rRNA gene tree (Figure 2).

16S rRNA, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, and *trpB* gene sequence analysis of *Streptomyces* sp.

Results of 16S rRNA gene sequence analysis and MLSA using sequence fragments of five housekeeping genes, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, and *trpB* to seven *Streptomyces* isolates are shown in Table 3. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *recA*, *atpD*, *trpB* genes sequences are displayed in Figure 5 to 10, respectively.

The 3182BRRJ and 3212BRRJ isolates identified as *Streptomyces albiaxialis* and *Streptomyces kummingensis*, respectively, showed similarities greater than 99% in 16S rRNA gene sequence analysis only with these species (Table 3). The phylogenetic tree using 16S rRNA gene depicted in Figure 5 showed for these two isolates a high bootstrap value presenting isolated clusters from other type strains sequences (Figure 5). Although the *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *trpB* and *atpD* genes were sequenced, to date there are still not GenBank deposits of the aforementioned genes for these two species, except of *Streptomyces kummingensis gyrB* gene sequence. The phylogenetic tree using *gyrB* gene depicted in Figure 6 showed a distinct cluster topology with high bootstrap value confirming *S. kummingensis* identification.

The identification to species level of the 3207BRRJ isolate by the 16S rRNA gene sequence was not possible as it showed similarity greater than 98.70% with over 20 *Streptomyces* species. In the table 3 are shown only 5 similarities values to type strains. The *recA*, *trpB*, *rpoB*, and *atpD* genes sequence analysis confirming identified that this isolate belonged to *S. rubiginosohelvolus*. Only the phylogenetic trees constructed from the *recA* and *trpB* genes presented in their topologies isolated clusters and high bootstrap support value indicating good separation of this species (Figures 8 and 10).

The 3268BRRJ isolate presented higher similarity with *Streptomyces virginiae* with all genes studied (Table 3). In all phylogenetic trees constructed, except the 16S rRNA tree (Figure 5), the topology showed that 3268BRRJ isolate clustered with this species (Figures 6 to 10).

The 16S rRNA gene sequence analysis the 3341BRRJ, 3436BRRJ and 3512BRRJ isolates showed superior to 98.70% similarities with different *Streptomyces* species (Table 3). The other genes sequence analysis has not helped to the identification of these isolates.

Discussion

The IGPRs and aerobic actinomycetes are widely distributed in terrestrial and aquatic ecosystems throughout the world including hostile environments. Clean rooms are considered extreme environments since it selects microorganisms which tolerate chemical oxidizing agents, desiccation and UV irradiation. Therefore the “hardy” species survive and have the potential to gain access to pharmaceutical production. La Duc and co-workers (2007) demonstrated that not only spore forming *Bacillus* species but also a numerous bacterial “hardy” species considered physiologically flexible, as IGPRs and aerobic actinomycetes persist in the inhospitable conditions of clean room environments. In this study, we reported isolates from clean rooms that exhibited higher 16S rRNA sequence similarity to isolates isolated from different extreme environments. The isolate 3117BRRJ showed 99.27% 16S rRNA sequence similarity to a bacteria from acidic volcanic waters (NZ3, accession no. AF356018). The isolates 3712BRRJ and 3371BRRJ showed 100% by 16S rRNA sequence similarity to an uncultivated bacterium from marine sediment.

On the other hand, IGPRs and aerobic actinomycetes include also organisms that are recognized human pathogens. In the last few years, bacteria regarded as environmental have been found with increasing frequency in association with human infections as well as these microorganisms (Drancourt et al, 2004; Gil-Sande et al, 2006; Ko et al, 2007; Miyamoto et al, 2013; Sharma et al, 2012; Kirby et al, 2012; Pellegrini et al, 2012). Therefore, these reports highlight that the presence of IGPR and aerobic actinomycetes in clean rooms may present a risk of contamination of pharmaceutical products and consequently to public health. Therefore, the presence of aerobic and IGPR actinomycetes in clean areas can be hazardous of contamination of pharmaceuticals.

IGPRs are commonly termed "coryneform" a term that is used for convenience in the same way as the term "aerobic actinomycetes" is an informal designation for bacteria that belong to the *Actinomycetales* order. These organisms demonstrate wide phenotypic diversity, enormous heterogeneity and belong to different families, orders, classes and phylum. Microbiologists are often confronted with difficulty in phenotypic characterization of this heterogeneous group which compromises an accurate identification (Conville & Witebsky, 2011; Funke & Bernard, 2011).

Identification by gene sequencing is the accurate method to identify a wide variety of bacteria. The 16S rRNA gene is present in the genome of all prokaryotes and its primary structure is highly conserved within organisms of the same genus. This gene target is most commonly used for bacterial identification. However, 16S rRNA gene sequencing presents some limitations in bacterial identification (Woo et al, 2008). Other housekeeping genes such as the 65-kDa heat shock protein gene (*hsp65*), essential secretory protein A (*secA1*), gyrase B (*gyrB*) has been also performed to discriminate many bacterial species. Recently, sequence analysis of multiple housekeeping genes has

been regarded as an alternative technique for the identification and classification of diverse group of bacteria. The multilocus sequence analysis (MLSA) provides more informative nucleotide sites and reduce the effect the distorting effects of homologous recombination and horizontal gene transfer of a single gene (Gevers, 2005). In this context, the multilocus sequence analysis (MLSA) has been regarded as an alternative technique for the identification and classification of diverse group of bacteria (Takeda et al, 2010).

In this study, almost complete 16S rRNA sequences were obtained for all of the 48 isolates which could not be assigned to a genus by conventional identification procedures. The 16S rRNA sequence analysis allowed the identification to genus level for almost all strains. The strains from clean room environment were classified into 12 different genera belonging to 11 families. Only two strains of the 48 (4.16%), a genus assignment was not possible by molecular method. These isolates could be only discriminated at the family by this method and probably represents new taxa. One limitation of the 16S rRNA sequence analysis is its inability to discriminate among new bacterial taxa. However this methodology point toward the necessity to perform other approaches for taxonomic classification. Of the 48 isolates, 18 (37.5%) were identified at the species level by 16S rRNA sequencing (Table 1, 2 and 3). Another limitation this methodology occurs when microorganisms share almost complete 16S rRNA sequence identities and, consequently, cannot be reliably separated at the species level. Tables 1, 2 and 3 show isolates that could not be identified at the species level due to, too close relation among themselves and exhibit a >98.7% 16S rRNA sequence similarity with different species. In order to discriminate closely related species, several studies recommend the analysis of other housekeeping genes (Khamis et al, 2005; Petti et al; Almeida & Araújo, 2013). Sequence analysis of the *rpoB* gene was performed to

Corynebacterium strains as recommending Khamis and co-workers (2005) and Bernard and co-workers (2012). This analysis allowed the discrimination of two samples of this bacterial genus to species level (Table 1).

Sequences analysis of the housekeeping genes were carried out for the most commonly genera found in our study (*Microbacterium* and *Streptomyces*).

The genus *Microbacterium* is known since the 90s and is often found in the environment (Funke & Bernard, 2011; Koneman et al, 2008). Nowadays, *Microbacterium* genus comprises 81 described species (Euzéby, 2013). Seventeen isolates currently identified as *Microbacterium* were submitted of *rpoB* and *recA* gene sequence analyses. The use of 16S rRNA gene sequence analysis enabled us to identify five *Microbacterium* strains at the species level. The *recA* and *rpoB* genes sequence analysis allowed the identification of other three strains to species level.

Streptomyces genus is an aerobic actinomycete widely distributed in nature and is frequently isolated from soil and has pronounced industrial importance due to the products they synthesize. They are Gram-positive, filamentous and branched normally producing mycelium of fungi such as that of fragment forms small rods (Funke & Bernard, 2011; Koneman et al, 2008). The identification of *Streptomyces* species remains problematic, since there are currently more than 600 described species (Euzéby, 2013). Most species of *Streptomyces* shows 16S rRNA gene sequence similarity greater than 98.70% with different species preventing the conclusion of identification. Some studies have evaluated the application of the methodology of MLSA for the differentiation of *Streptomyces* clades (Rong & Huang, 2013; Rong et al, 2009; Rong et al, 2010). However in this study, for *Streptomyces* strains, the sequence analysis of *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *trpB* housekeeping genes subsidized the identification of only one strain to species level (Table 3).

Phylogenetic analysis have shown stable topologies with high bootstrap values corroborating with the similarity results shown in Tables 1, 2 and 3 (Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10). Unfortunately, in the present study, the phylogenetic analysis using concatenated gene sequences could not be performed. The absence of sequences of housekeeping genes for several bacterial species on databases hindered this analysis. Thus, MLSA methodology could help the identification bacterial only after validating of a scheme using type strains of the majority species of the genus at issue. The determination of almost complete 16S rRNA gene sequence and the deposit into database is required to taxonomic description of bacterial species. Therefore, the 16SrRNA sequence analysis is most suitable for the identification of culturable environmental strains due to enormous diversity this microorganism.

Moissl and colleagues (2007) suggest research on non-Bacillus microorganisms and their potential impact on clean room operations. All microorganisms implicated in sterility test failures, including those in the environment in which the sterile test is performed, must be identified (USP Pharmacopoeia, 2013). It is generally understood that the identity of microbial isolates will be useful in investigating microbial contamination. This study yields knowledge on microbiota in clean room environments and may also aid in the investigation of the source of contamination of other (industrial or medical) clean rooms as well as pharmaceutical manufacturing areas.

The 16S rRNA sequence analysis was an effective means for identifying irregular Gram positive rods and aerobic actinomycetes not identifiable by phenotypic methods, since it was able to resolve the identification 95.83% at genus level. This methodology also provided an opportunity to detect possible new bacterial genus and species from clean rooms. Seven strains remained unidentified to species level and were

likely candidates to new species. However, it should be subject to further analysis such as cell wall composition and DNA-DNA reassociation to determine the species.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) under award number E 26/210-479/2007. We thank the PDTIS/FIOCRUZ genomic platform for sequencing. We acknowledge Ana Carolina Paulo Vicente for encouragement.

Disclosure statement

No competing financial interests exist.

References

- Almeida LA, Araujo R. Highlightson molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol.* 13:67-75, 2013.
- Baio P.V., Mota H.F., Freitas A.D., Gomes D.L., Ramos J.N., Sant'anna L.O., Souza M.C., Camello T.C., Hirata Junior R., Vieira V.V., Mattos-Guaraldi A.L. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* v. 108, n. 1, p. 23-9, 2013.
- Bernard, K. The Genus *Corynebacterium* and other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 50, n. 10, p. 3152-3158, 2012.
- Crapart S, Fardeau M L, Cayol J L, Thomas P, Sery C, Olliver B & Combet-Blanc Y. *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:287-292, 2007.
- Conville P. S., Witebsky F. *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces,* and Other Aerobic Actinomycetes. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W. *Manual of Clinical Microbiology.* 10th. Ed. ASM Press, Washington. D. C, 2011.
- Cundell A M. *Microbial Identification Strategies in the Pharmaceutical Industry.* *Technology Application* 60: 111-123, 2006.

Datta P, Arora S, Jain R, Chander J, van de Sande W. Secondary peritonitis caused by *Streptomyces_ viridis*. J Clin Microbiol. 50 (5):1813-4, 2012.

Donachie S P, Christenson B W, Kunkel D D, Malahoff A & Alam M. Microbial community in acidic hydrothermal waters of volcanically active White Island, New Zealand. Extremophiles 6: 419–425, 2002.

Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral J-P & Raoult D. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. Journal of Clinical Microbiology 38: 3623–3630, 2000.

Drancourt M, Berger P & Raoult D. Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. Journal of Clinical Microbiology 42: 2197-2202, 2004.

Conventional on The Elaboration of a European Pharmacopoeia. Sterility. In: Council of Europe (ed) European Pharmacopoeia 6.0, vol. 1, Council of Europe, Strasbourg, pp.155-159, 2008.

Enoch DA, Richardson MP, Hill RL, Scorer PM, Sismey A. Central venous catheter-related bacteraemia due to *Microbacterium paraoxydans* in a patient with no significant immunodeficiency. J Clin Pathol. 64 (2):179-80, 2011.

Euzeby J P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. www.bacterio.cict.fr. 2008.

Funke, G; Bernard, K. A. Coryneform Gram-Positive Rods. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th. Ed. ASM Press, Washington. D. C, 2011.

Giammanco G M, Pignato S, Grimont P A D, Grimont F, Santangelo C, Leonardi G, Giuffrida A, Legname V & Giammanco G. Interstitial pulmonary inflammation due to *Microbacterium* sp. after heart transplantation. Journal of Medical Microbiology 55: 335-339, 2006.

Gil-Sande E, Brun-Otero M, Campo-Cerecedo F, Esteban E, Aguilar L & García-de-Lomas J. Etiological Misidentification by Routine Biochemical Tests of Bacteremia Caused by *Gordonia terrae* Infection in the Course of an Episode of Acute Cholecystitis. Journal of Clinical Microbiology 44: 2645–2647, 2006

Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 58, n. 1, p. 149-59, 2008.

Halls N. Microbiological environmental monitoring. In: Halls N (ed) Microbial Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms, CRC Press, Boca Raton, pp. 23-51, 2004.

Kirby R, Sangal V, Tucker NP, Zakrzewska-Czerwinska J, Wierzbicka K, Herron PR, Chu CJ, Chandra G, Fahal AH, Goodfellow M, Hoskisson PA. Draft genome sequence of the human pathogen *Streptomyces somaliensis*, a significant cause of actinomycetoma. *J Bacteriol.* 194(13):3544-5, 2012.

Ko K S, Oh W S, Lee M Y, Peck K R, Lee N Y & Song J-H (2007) A new *Microbacterium* species isolated from the blood of a patient with fever: *Microbacterium pyrexiae* sp. nov. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57: 393–397, 2007.

La Duc M T, Kern R & Venkateswaran K. Microbial monitoring of spacecraft and associated environments. *Microbial Ecology* 47: 150-158, 2004.

La Duc M T, Dekas A, Osman S, Moissl C, Newcombe D & Venkateswaran K. Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating the Extreme Conditions of Clean Room Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2600–2611, 2007.

Laffineur K, Avesani V, Cornu G, Charlier J, Janssens M, Wauters G & Delmée M. Bacteremia Due to a Novel *Microbacterium* Species in a Patient with Leukemia and Description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2242–2246, 2003.

Lau S K P, Woo P C Y, Woo G K S & Yuen K Y. Catheter-Related *Microbacterium* Bacteremia Identified by 16S rRNA Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2681–2685, 2002.

Miyamoto M, Sakurada T, Oishi D, Koitabashi K, Hanada K, Takemura H, Shibagaki Y, Yasuda T, Kimura K. The first case report of peritoneal dialysis related peritonitis caused by *Microbacterium paraoxydans*. *Clin Nephrol.* 79 (5):402-6, 2013.

Moissl C, Osman S, La Duc M T, Dekas A, Brodie E, DeSantis T & Venkateswaran K. Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 509–521, 2007.

Nagarkar P P, Ravetkar S D & Watve M G. Oligophilic Bacteria as Tools To Monitor Aseptic Pharmaceutical Production units. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1371–1374, 2001.

Patel J B, Wallace Jr R J, Brown-Elliott B A, Taylor T, Imperatrice C, Leonard D G B, Wilson R W, Mann L, Jost K C & Nachamkin I. Sequence-Based Identification of Aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2530–2540, 2004.

Pellegrini GJ Jr, Graziano JC, Ragunathan L, Bhat MA, Hemashettar BM, Brown JM. Scalp abscess due to *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, first report in a human infection. *J Clin Microbiol.* 50 (4):1484-6, 2012.

Petti C A. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 44: 1108–1114, 2007.

Richert K, Brambilla E, Stackebrandt E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based

upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16S rRNA genes. *Systematic and Applied Microbiology*. v. 30, n. 2, p. 102-8, 2007.

Rong X, Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Syst Appl Microbiol*. 35 (1):7-18, 2012.

Rong X, Liu N, Ruan J, Huang Y. Multilocus sequence analysis of *Streptomyces griseus* isolates delineating intraspecific diversity in terms of both taxonomy and biosynthetic potential. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 98 (2):237-48, 2010.

Rong X, Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60 (Pt 3):696-703, 2010.

Rong X, Guo Y, Huang Y. Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solvifaciens*. *Syst Appl Microbiol*. 32 (5):314-22, 2009.

Roux V, Drancourt M, Stein A, Riegel P, Raoult D & La Scola B. *Corynebacterium* Species Isolated from Bone and Joint Infections Identified by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2231–2233, 2004.

Sharma P, Diene SM, Gimenez G, Robert C, Rolain JM. Genome sequence of *Microbacterium yannicii*, a bacterium isolated from a cystic fibrosis patient. *J Bacteriol*. 194 (17):4785, 2012.

Sutton S V W & Cundell A M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. *Pharmacoepial Forum* 30: 1884-1894, 2004.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599, 2007.

Thompson J.D, Gibson T.J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D.G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882, 1997.

United States Pharmacopeial Convention . Microbiological Evaluation of Clean Rooms and other Controlled Environments. In: United States Pharmacopeial Convention (ed), *The United States Pharmacopoeia*, vol. 31, Rockville, pp. 582-589, 2011.

Venkateswaran K, Satomi M, Chung S, Kern R, Koukol R, Basic C & White D. Molecular Microbial Diversity of a Spacecraft Assembly Facility. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 311–320, 2001.

Watts JL, Lowery DE, Teel JF & Rossbach S. Identification of corynebacterium bovis and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* 83:2373-9, 2000.

Whyte W. Cleanroom Technology. In: W. Whyte (ed) *Fundamental of Design, Testing and Operation*, John Wiley & Sons Ltda, England, pp. 167-175, 2001.

Table 1. 16S rRNA-based identification of 24 phenotypically unidentified bacterial isolates.

16S rRNA-based identification	pb	Isolate Number/ GenBank Accession no.	Closet match ^a	Reference sequence (Accession no.)	Similarity (%)
Isolates exhibiting >98.7% 16S rRNA sequence similarity with a deposited sequence (n= 11)					
	1310	3299BRRJ/ FJ200388		AJ251418	99.69
<i>Brevibacterium casei</i>			<i>Brevibacterium casei</i> (T) ^b		
<i>Cellulomonas hominis</i>	1306	3089BRRJ/ FJ200381	<i>Cellulomonas hominis</i> (T)	X82598	99.23
<i>Corynebacterium glaucum</i> ^c	1255	3345BRRJ/	<i>Corynebacterium glaucum</i> (T)	AJ431634	99.68
<i>Corynebacterium simulans</i> ^c	1335	3316BRRJ/ FJ200390	<i>Corynebacterium simulans</i> (T)	AF012837	99.93
	1392	3361BRRJ/ FJ200385	<i>Dermabacter hominis</i> (T)	X91034	98.71
<i>Dermabacter hominis</i>					
<i>Gordonia terrae</i>	1488	3369aBRRJ/ FJ200386	<i>Gordonia terrae</i> (T)	X79286	99.93
<i>Gordonia terrae</i>	1487	3369bBRRJ/ FJ200387	<i>Gordonia terrae</i> (T)	X79286	99.93
<i>Janibacter terrae</i>	1319	3538BRRJ/FJ876399	<i>Janibacter terrae</i> (T)	AF176948	99.02
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	1480	3032BRRJ/ FJ200394	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> (T)	AF430066	99.73
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	1471	3165BRRJ/ FJ200395	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> (T)	AF430066	99.73
	1495	27302BRRJ/FJ200396	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> (T)	AF430066	99.66
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>					
Isolates exhibiting >98.7% 16S rRNA sequence similarity with different species (n= 08)					
<i>Arthrobacter</i> sp.	1342	3401BRRJ/ FJ200380	<i>Arthrobacter defluvii</i> (T)	AM409361	99.03
			<i>Arthrobacter niigatensis</i> (T)	AB248526	99.92
<i>Corynebacterium</i> sp. ^c	1499	3524BRRJ/ FJ876397	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> (T)	AJ438050	99.47
			<i>Corynebacterium accolens</i> (T)	AJ439346	98.80
<i>Corynebacterium</i> sp. ^c	1498	3020BRRJ/ FJ200389	<i>Corynebacterium xerosis</i> (T)	X81914 AJ292762	99.77
			<i>Corynebacterium freneyi</i> (T)		99.12
	1193	3097BRRJ/ FJ200391	<i>Curtobacterium luteum</i> (T)	X77437	99.41
<i>Curtobacterium</i> sp			<i>Curtobacterium citreum</i> (T)	X77436	99.33
	1409	3490BRRJ/ FJ876396	<i>Curtobacterium pusillum</i> (T)	AJ784400	99.50
<i>Curtobacterium</i> sp			<i>Curtobacterium luteum</i> (T)	X77437	99.35
	1297	3536BRRJ/ FJ876398	<i>Dietzia maris</i> (T)	X79290	99.92
<i>Dietzia</i> sp			<i>Dietzia schimae</i> (T)	EU375845	99.77
<i>Exiguobacterium</i> sp.	1446	3069BRRJ/ FJ200383	<i>Exiguobacterium profundum</i> (T)	AY818050	99.45
			<i>Exiguobacterium aestuarii</i> (T)	AY594264	99.24
<i>Exiguobacterium</i> sp.	1309	3225BRRJ/ FJ200384	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> (T)	AM072764	99.69
			<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (T)	DQ019166	99.62

Isolates exhibiting 97–98.7% 16S rRNA sequence similarity with a deposited sequence (type strain) (n= 03)

<i>Agromyces</i> sp.	1495	3098BRRJ/ FJ200379	<i>Agromyces ulmi</i> (T)	AY427830	97.32
<i>Cellulomonas</i> sp.	1478	3335BRRJ/ FJ200382	<i>Cellulomonas composti</i> (T)	AB166887	98.34
<i>Nocardioides</i> sp.	1494	3117BRRJ/FJ200392	<i>Nocardioides alkalitolerans</i> (T)	AY633969	97.03

Isolates exhibiting <97 16S rRNA sequence Similarity with a deposited sequence (n= 02)

<i>Propionibacterinae</i>	1501	3712BRRJ/FJ200393	<i>Microlunatus phosphovorus</i> (T)	Z78207	94.31
			<i>Propionicicella superfundia</i> (T)	DQ176646	93.77
			<i>Luteococcus peritonei</i> (T)	AJ132334	93.65
			<i>Propionimonas paludicola</i> (T)	AB078858	93.61
			<i>Propioniferax innocua</i> (T)	AF227165	93.16
<i>Propionibacterinae</i>	1491	3771BRRJ/FJ872522	<i>Friedmanniella lucida</i> (T)	AB445454	92.80
			<i>Microlunatus phosphovorus</i> (T)	Z78207	94.37
			<i>Propionicicella superfundia</i> (T)	DQ176646	93.83
			<i>Luteococcus peritonei</i> (T)	AJ132334	93.72
			<i>Propionimonas paludicola</i> (T)	AB078858	93.68
			<i>Propioniferax innocua</i> (T)	AF227165	93.22
			<i>Friedmanniella lucida</i> (T)	AB445454	92.87

^a From comparison with the GenBank and RDP II database (Jan 2013);

^b(T) Type strain; ^c It was performed *rpoB* sequences analysis for these four isolates.

Table 2. Multilocus sequence analysis (MLSA) based on the *Microbacterium spp.* sequences of three housekeeping genes: 16S rRNA, *recA* and *rpoB*

strain	16S rRNA similarity (%)	pb	<i>recA</i> similarity (%)	pb	<i>rpoB</i> similarity (%)	pb	Conclusion
3080BRRJ	99.66 <i>Microbacterium oleivorans</i>	1503	88.81 <i>Microbacterium testaceum</i>	735	92.70 <i>Microbacterium lacticum</i>	870	<i>Microbacterium oleivorans</i>
	98.31 <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>		88.30 <i>Microbacterium flavescens</i>		92.95 <i>Microbacterium flavescens</i>		
	98.57 <i>Microbacterium testaceum</i>				92.56 <i>Microbacterium chocolatum</i>		
3248BRRJ	98.98 <i>Microbacterium testaceum</i>	1501	90.07 <i>Microbacterium testaceum</i>	714	94.89 <i>Microbacterium testaceum</i>	918	<i>Microbacterium testaceum</i>
	98.29 <i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>		89.46 <i>Microbacterium flavescens</i>		93.80 <i>Microbacterium arborescens</i>		
	98.09 <i>Microbacterium resistens</i>						
1942BRRJ	99.52 <i>Microbacterium marinilacus</i>	1505	90.76 <i>Microbacterium flavescens</i>	745	92.18 <i>Microbacterium hominis</i>	863	<i>Microbacterium marinilacus</i>
	97.42 <i>Microbacterium arborescens</i>		89.90 <i>Microbacterium lacticum</i>		91.98 <i>Microbacterium thalassium</i>		
	97.29 <i>Microbacterium imperiale</i>		87.71 <i>Microbacterium testaceum</i>		91.94 <i>Microbacterium flavescens</i>		
3498BRRJ	99.40 <i>Microbacterium oleivorans</i>	1502	89.02 <i>Microbacterium testaceum</i>	661	93.23 <i>Microbacterium lacticum</i>	984	<i>Microbacterium oleivorans</i>
	98.29 <i>Microbacterium testaceum</i>		89.57 <i>Microbacterium imperiale</i>		93.03 <i>Microbacterium flavescens</i>		
	98.04 <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>		88.57 <i>Microbacterium flavescens</i>		92.93 <i>Microbacterium testaceum</i>		
3155BRRJ	99.50 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	1512	98.33 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	650	96.39 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	831	<i>Microbacterium laevaniformans</i>
	98.58 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		89.42 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		93.38 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		
3016BRRJ	99.79 <i>Microbacterium oxydans</i>	1494	99.86 <i>Microbacterium oxydans</i>	925	100.00 <i>Microbacterium oxydans</i>	925	<i>Microbacterium oxydans</i>
	99.72 <i>Microbacterium maritipicum</i>		92.53 <i>Microbacterium liquefaciens</i>		96.64 <i>Microbacterium maritipicum</i>		
	99.59 <i>Microbacterium liquefaciens</i>		92.32 <i>Microbacterium maritipicum</i>		96.54 <i>Microbacterium liquefaciens</i>		
	98.73 <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>				95.57 <i>Microbacterium luteolum</i>		
3019BRRJ	99.93 <i>Microbacterium oxydans</i>	1509	99.72 <i>Microbacterium oxydans</i>	870	99.43 <i>Microbacterium oxydans</i>	870	<i>Microbacterium oxydans</i>
	99.86 <i>Microbacterium maritipicum</i>		92.38 <i>Microbacterium liquefaciens</i>		96.21 <i>Microbacterium maritipicum</i>		
	99.73 <i>Microbacterium liquefaciens</i>		92.16 <i>Microbacterium maritipicum</i>		96.09 <i>Microbacterium liquefaciens</i>		
	98.82 <i>Microbacterium luteolum</i>		91.07 <i>Microbacterium luteolum</i>		94.83 <i>Microbacterium luteolum</i>		
3188BRRJ	99.43 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	1500	95.41 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	752	99.63 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	821	<i>Microbacterium laevaniformans</i>
	98.70 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		91.35 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		93.17 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		
	99.38 <i>Microbacterium lacus</i>		93.02 <i>Microbacterium lacticum</i>		95.13 <i>Microbacterium hominis</i>		
	99.24 <i>Microbacterium aoyamense</i>				95.13 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		
	98.79 <i>Microbacterium pumilum</i>				93.71 <i>Microbacterium lacticum</i>		

strain	16S rRNA similarity (%)	pb	recA similarity (%)	pb	rpoB similarity (%)	pb	Conclusion
3249BRRJ	99.46 <i>Microbacterium aurum</i>	1524	99.66 <i>Microbacterium aurum</i>	720	97.57 <i>Microbacterium aurum</i>	988	<i>Microbacterium sp.</i>
	99.25 <i>Microbacterium lacus</i>		92.27 <i>Microbacterium flavescens</i>		94.76 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		
	99.10 <i>Microbacterium aoyamense</i>		92.35 <i>Microbacterium lacticum</i>		94.66 <i>Microbacterium hominis</i>		
3487BRRJ	99.86 <i>Microbacterium esteraromaticum</i>	1494	96.10 <i>Microbacterium esteraromaticum</i>	774	98.95 <i>Microbacterium esteraromaticum</i>	860	<i>Microbacterium sp.</i>
	99.18 <i>M. arabinogalactanolyticum</i>		89.73 <i>Microbacterium flavescens</i>		91.77 <i>Microbacterium resistens</i>		
3561BRRJ	99.29 <i>Microbacterium pumilum</i>	1503	90.45 <i>Microbacterium lacticum</i>	650	92.38 <i>Microbacterium aurum</i>	824	<i>Microbacterium sp.</i>
	99.09 <i>Microbacterium deminutum</i>		90.25 <i>Microbacterium aurum</i>		92.15 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		
	98.86 <i>Microbacterium fluvii</i>		89.09 <i>Microbacterium flavescens</i>		92.01 <i>Microbacterium hominis</i>		
	98.70 <i>Microbacterium schleiferi</i>		89.15 <i>Microbacterium laevaniformans</i>		91.66 <i>Microbacterium lacticum</i>		
3556BRRJ	99.46 <i>Microbacterium paraoxydans</i>	1502	90.80 <i>Microbacterium luteolum</i>	650	93.80 <i>Microbacterium oxydans</i>	851	<i>Microbacterium sp.</i>
	98.98 <i>Microbacterium oxydans</i>		90.57 <i>Microbacterium flavescens</i>		93.78 <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>		
	98.50 <i>Microbacterium resistens</i>		90.23 <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>		93.11 <i>Microbacterium maritipicum</i>		
	98.41 <i>Microbacterium luteolum</i>		89.09 <i>Microbacterium oxydans</i>		93.11 <i>Microbacterium liquefaciens</i>		
			88.57 <i>Microbacterium testaceum</i>		91.54 <i>Microbacterium keratanolyticum</i>		
3223BRRJ	98.37 <i>Microbacterium flavescens</i>	1500	90.99 <i>Microbacterium flavescens</i>	690	93.50 <i>Microbacterium chocolatum</i>	860	<i>Microbacterium sp.</i>
	98.26 <i>Microbacterium thalassium</i>		90.76 <i>Microbacterium lacticum</i>		92.73 <i>Microbacterium thalassium</i>		
	98.21 <i>Microbacterium insulae</i>		89.13 <i>Microbacterium kitamiense</i>		92.69 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		
	98.16 <i>M. trichothecenolyticum</i>				92.23 <i>Microbacterium flavescens</i>		
3227BRRJ	98.44 <i>Microbacterium thalassium</i>	1499	91.23 <i>Microbacterium flavescens</i>	765	93.42 <i>Microbacterium chocolatum</i>	800	<i>Microbacterium sp.</i>
	98.40 <i>Microbacterium flavescens</i>		90.91 <i>Microbacterium lacticum</i>		93.18 <i>Microbacterium thalassium</i>		
	98.28 <i>Microbacterium insulae</i>		89.62 <i>Microbacterium kitamiense</i>		92.79 <i>Microbacterium dextranolyticum</i>		
	98.22 <i>M. trichothecenolyticum</i>		88.38 <i>Microbacterium testaceum</i>		92.28 <i>Microbacterium flavescens</i>		
3407BRRJ	98.36 <i>M. trichothecenolyticum</i>	1503	92.43 <i>Microbacterium lacticum</i>	766	93.90 <i>Microbacterium testaceum</i>	1000	<i>Microbacterium sp.</i>
	98.21 <i>Microbacterium thalassium</i>		92.34 <i>Microbacterium flavescens</i>		93.63 <i>Microbacterium flavescens</i>		
	97.88 <i>Microbacterium resistens</i>		89.57 <i>Microbacterium thalassium</i>		93.46 <i>Microbacterium thalassium</i>		
3408BRRJ	98.70 <i>Microbacterium marinilacus</i>	1508	90.29 <i>Microbacterium flavescens</i>	756	93.55 <i>Microbacterium flavescens</i>	826	<i>Microbacterium sp.</i>
	97.70 <i>Microbacterium imperiale</i>		90.55 <i>Microbacterium lacticum</i>		92.56 <i>Microbacterium thalassium</i>		
	96.70 <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>		89.10 <i>Microbacterium thalassium</i>		92.54 <i>Microbacterium aurum</i>		
	96.59 <i>Microbacterium thalassium</i>		86.62 <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>		90.05 <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>		

Table 3. Multilocus sequence analysis (MLSA) based on the *Streptomyces spp.* sequences of six housekeeping genes: 16S rRNA, *recA*, *rpoB*, *gyrB*, *atpD*, and *trpB*.

Strains	16S rRNA similarity (%)	<i>recA</i> similarity (%)	<i>rpoB</i> similarity (%)	<i>gyrB</i> similarity (%)	<i>atpD</i> similarity (%)	<i>trpB</i> similarity (%)	Conclusion
3182BRRJ	99.13 <i>Streptomyces albiaxialis</i>	93.54 <i>Streptomyces rangoonensis</i>	93.83 <i>Streptomyces rangoonensis</i>	89.32 <i>Streptomyces luteireticuli</i>	91.42 <i>S. bingchengensis</i>	85.04 <i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>Streptomyces albiaxialis</i>
		90.64 <i>S. olivaceiscleroticus</i>	90.78 <i>Streptomyces hirosimensis</i>	89.26 <i>Streptomyces moharaensis</i>	91.17 <i>Streptomyces flavogriseus</i>	84.22 <i>Streptomyces scabiei</i>	
		90.40 <i>Streptomyces violaceusniger</i>	90.58 <i>Streptomyces aureoversilis</i>		90.82 <i>Streptomyces griseus</i>		
3212BRRJ	99.38 <i>Streptomyces kunmingensis</i>	93.92 <i>Streptomyces avermitilis</i>	92.56 <i>Streptomyces avermitilis</i>	96.14 <i>Streptomyces kunmingensis</i>	96.89 <i>Streptomyces scabiei</i>	95.30 <i>Streptomyces scabiei</i>	<i>Streptomyces kunmingensis</i>
		93.79 <i>Streptomyces scabiei</i>	92.01 <i>Streptomyces incarnatus</i>	89.42 <i>Streptomyces pallidus</i>	95.57 <i>Streptomyces avermitilis</i>	92.40 <i>Streptomyces coelicolor</i>	
3207BRRJ	100.00 <i>S. rubiginosohelvolus</i>	99.45 <i>S. rubiginosohelvolus</i>	99.72 <i>S. rubiginosohelvolus</i>	98.38 <i>Streptomyces albovinaceus</i>	99.63 <i>S. rubiginosohelvolus</i>	99.45 <i>S. rubiginosohelvolus</i>	<i>S. rubiginosohelvolus</i>
	100.00 <i>Streptomyces Mediolani</i>	98.08 <i>Streptomyces sindenensis</i>	98.60 <i>Streptomyces praecox</i>	98.29 <i>Streptomyces griseinus</i>	99.02 <i>Streptomyces puniscabiei</i>	98.49 <i>Streptomyces sindenensis</i>	
	100.00 <i>Streptomyces griseinus</i>	96.58 <i>S. griseus subsp griseus</i>	98.19 <i>Streptomyces sindenensis</i>	98.19 <i>S. rubiginosohelvolus</i>	98.93 <i>S. griseus subsp griseus</i>	97.37 <i>S. griseus subsp griseus</i>	
	99.93 <i>Streptomyces tanashiensis</i>			97.81 <i>Streptomyces griseus</i>			
	99.39 <i>Streptomyces griseus</i>						
3268BRRJ	99.66 <i>Streptomyces virginiae</i>	96.63 <i>Streptomyces virginiae</i>	98.52 <i>Streptomyces virginiae</i>	97.35 <i>Streptomyces virginiae</i>	99.19 <i>Streptomyces virginiae</i>	95.95 <i>Streptomyces virginiae</i>	<i>Streptomyces sp</i>
	99.66 <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	93.93 <i>Streptomyces aureoversilis</i>	90.36 <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	93.58 <i>Streptomyces goshikiensis</i>	95.24 <i>Streptomyces scabiei</i>	93.58 <i>Streptomyces davawensis</i>	
	99.56 <i>Streptomyces colombiensis</i>	93.54 <i>Streptomyces parvisporogenes</i>		93.58 <i>Streptomyces subrutitus</i>	94.88 <i>Streptomyces davawensis</i>	92.74 <i>S. griseus subsp griseus</i>	
	99.46 <i>Streptomyces goshikiensis</i>	90.02 <i>Streptomyces cinnamomensis</i>		87.24 <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	94.75 <i>Streptomyces stelliscabiei</i>	92.34 <i>Streptomyces coelicolor</i>	
				93.78 <i>Streptomyces cinnamomensis</i>			
3341BRRJ	99.11 <i>Streptomyces aurantiacus</i>	95.61 <i>Streptomyces tauricus</i>	95.92 <i>Streptomyces tauricus</i>	93.41 <i>Streptomyces tauricus</i>	97.46 <i>Streptomyces scabiei</i>	94.22 <i>Streptomyces aurantiacus</i>	<i>Streptomyces sp</i>
	98.97 <i>Streptomyces tauricus</i>	95.00 <i>Streptomyces avermitilis</i>	94.27 <i>Streptomyces aurantiacus</i>	91.55 <i>Streptomyces aurantiacus</i>	96.44 <i>Streptomyces avermitilis</i>	93.53 <i>S. viridodiataticus</i>	
	98.97 <i>Streptomyces umbrinus</i>	94.21 <i>Streptomyces aurantiacus</i>	93.54 <i>Streptomyces umbrinus</i>	91.41 <i>Streptomyces panayensis</i>	93.53 <i>Streptomyces aurantiacus</i>	93.00 <i>Streptomyces albireticuli</i>	
		94.00 <i>Streptomyces umbrinus</i>			92.48 <i>Streptomyces umbrinus</i>	92.83 <i>Streptomyces tauricus</i>	
				91.87 <i>Streptomyces tauricus</i>			
3436BRRJ	100.00 <i>Streptomyces rubrogriseus</i>	97.59 <i>Streptomyces olivaceus</i>	100.00 <i>Streptomyces violaceoruber</i>	98.79 <i>Streptomyces coelicolor</i>	100.00 <i>Streptomyces coelestis</i>	98.77 <i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Streptomyces sp</i>
	99.93 <i>Streptomyces albobrogriseolus</i>	97.58 <i>Streptomyces flavidovirens</i>	99.69 <i>Streptomyces coelestis</i>	96.88 <i>Streptomyces olivaceus</i>	99.77 <i>Streptomyces violaceoruber</i>	95.10 <i>Streptomyces viridiviolaceus</i>	
	99.87 <i>Streptomyces coelestis</i>	97.06 <i>Streptomyces coelicolor</i>	98.40 <i>Streptomyces coelicolor</i>		99.28 <i>Streptomyces coelicolor</i>		
	99.87 <i>Streptomyces violaceoruber</i>	97.06 <i>Streptomyces lividans</i>	97.26 <i>Streptomyces olivaceus</i>		99.27 <i>Streptomyces lividans</i>		
	97.91 <i>Streptomyces coelicolor</i>						
3512BRRJ	99.44 <i>Streptomyces lomondensis</i>	97.32 <i>S. violaceochromogenes</i>	96.29 <i>S. violaceochromogenes</i>	95.70 <i>Streptomyces africanus</i>	98.85 <i>S. violaceochromogenes</i>	93.08 <i>Streptomyces viridiviolaceus</i>	<i>Streptomyces sp</i>
	99.39 <i>Streptomyces parvulus</i>	96.65 <i>Streptomyces flavidovirens</i>	95.07 <i>Streptomyces incarnatus</i>	95.69 <i>Streptomyces afghaniensis</i>	94.02 <i>Streptomyces coelicolor</i>	93.00 <i>S. violaceochromogenes</i>	
	99.32 <i>Streptomyces bellus</i>	96.25 <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	94.56 <i>Streptomyces antibioticus</i>	94.59 <i>Streptomyces pallidus</i>	94.02 <i>Streptomyces lividans</i>		
	99.32 <i>Streptomyces janthinus</i>			88.05 <i>Streptomyces parvulus</i>			

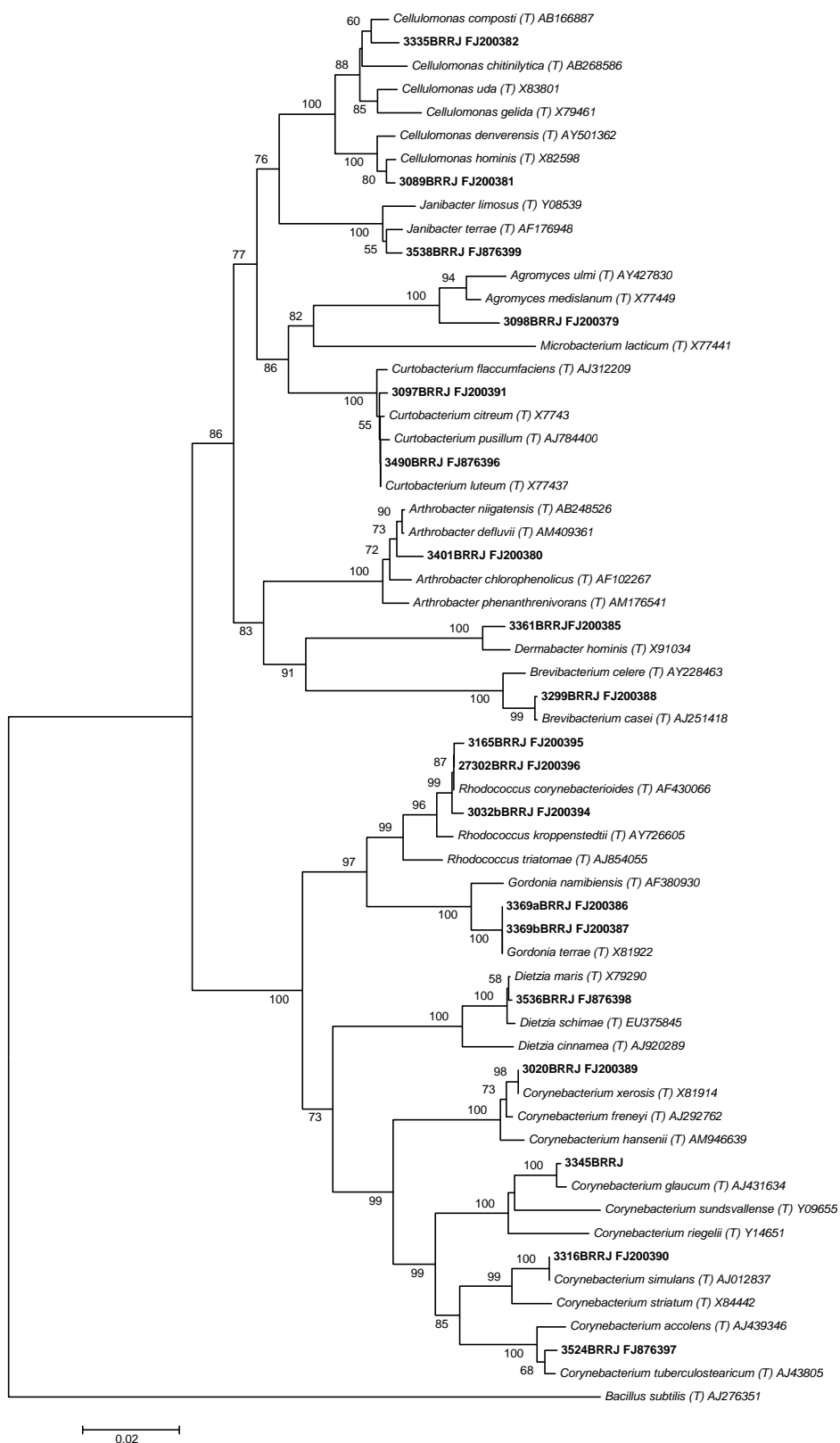


Figure 1. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using 16S rRNA gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Bacillus subtilis* (T) AJ276351 sequence was used as an outgroup.

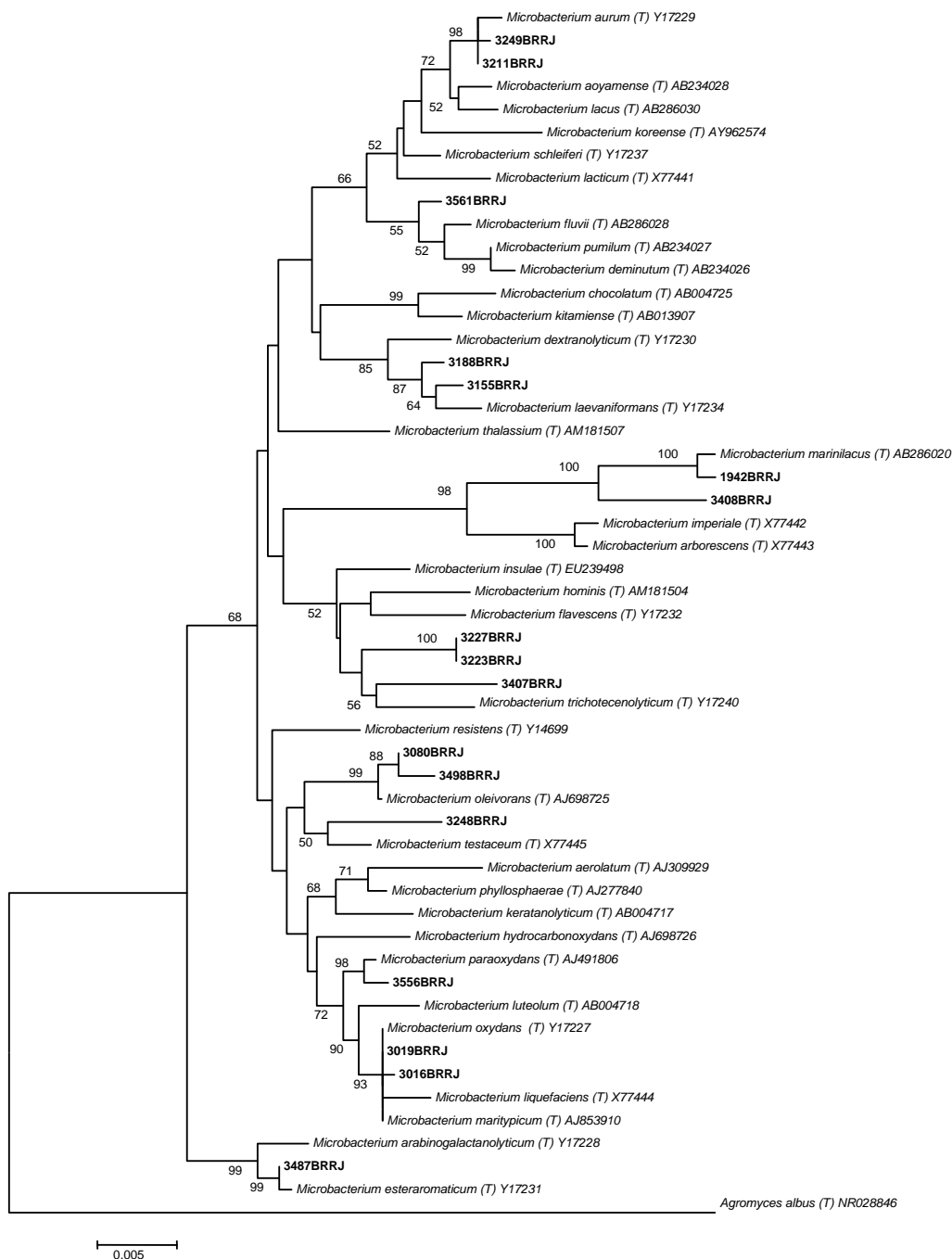


Figure 2. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using 16S rRNA gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Agromyces albus* (T) NR028846 sequence was used as an outgroup.

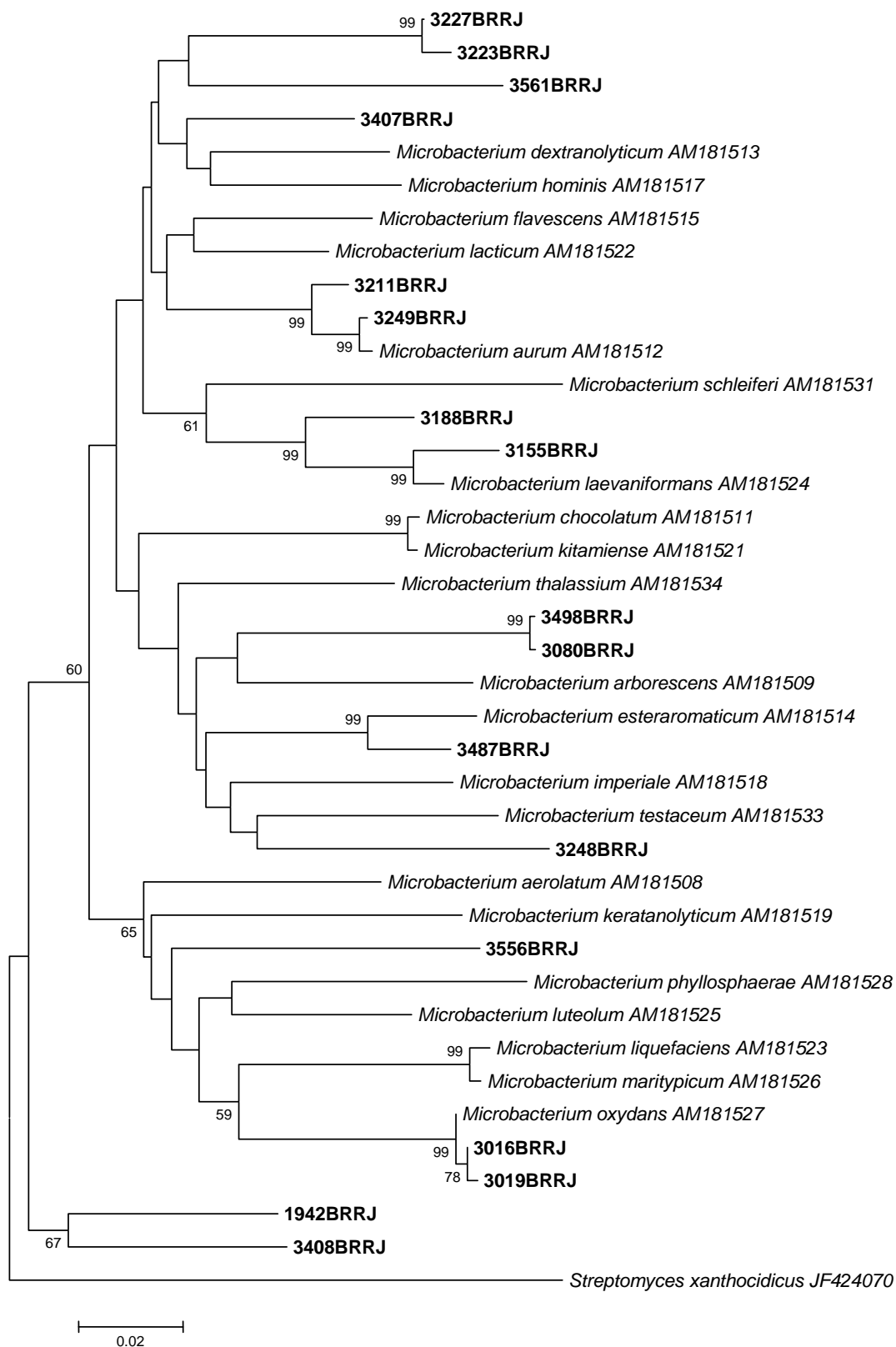


Figure 3. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using *recA* gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Streptomyces xanthocidicus* JF424070 sequence was used as an outgroup.

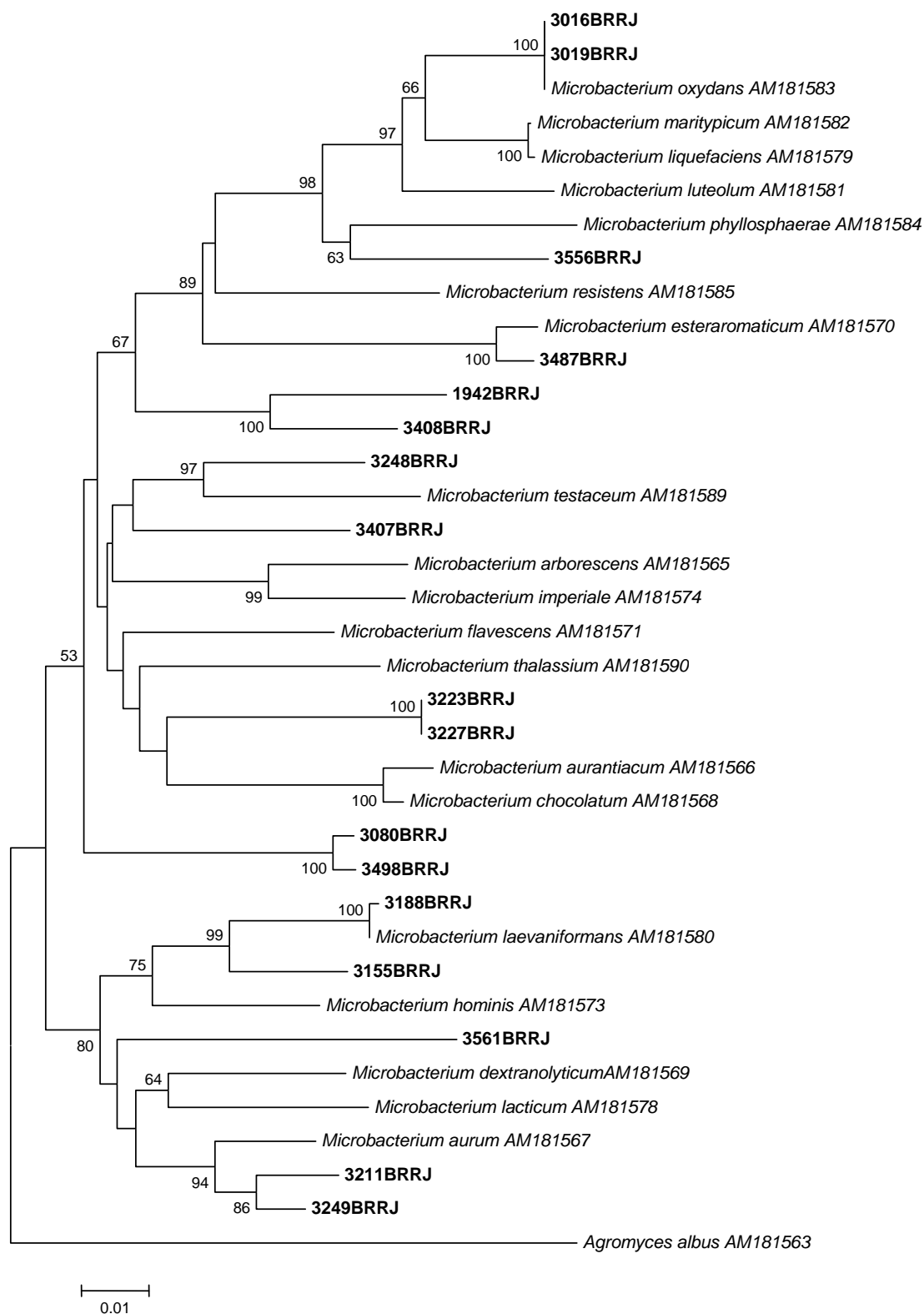


Figure 4. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using *rpoB* gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Agromyces albus* AM181563 sequence was used as an outgroup.

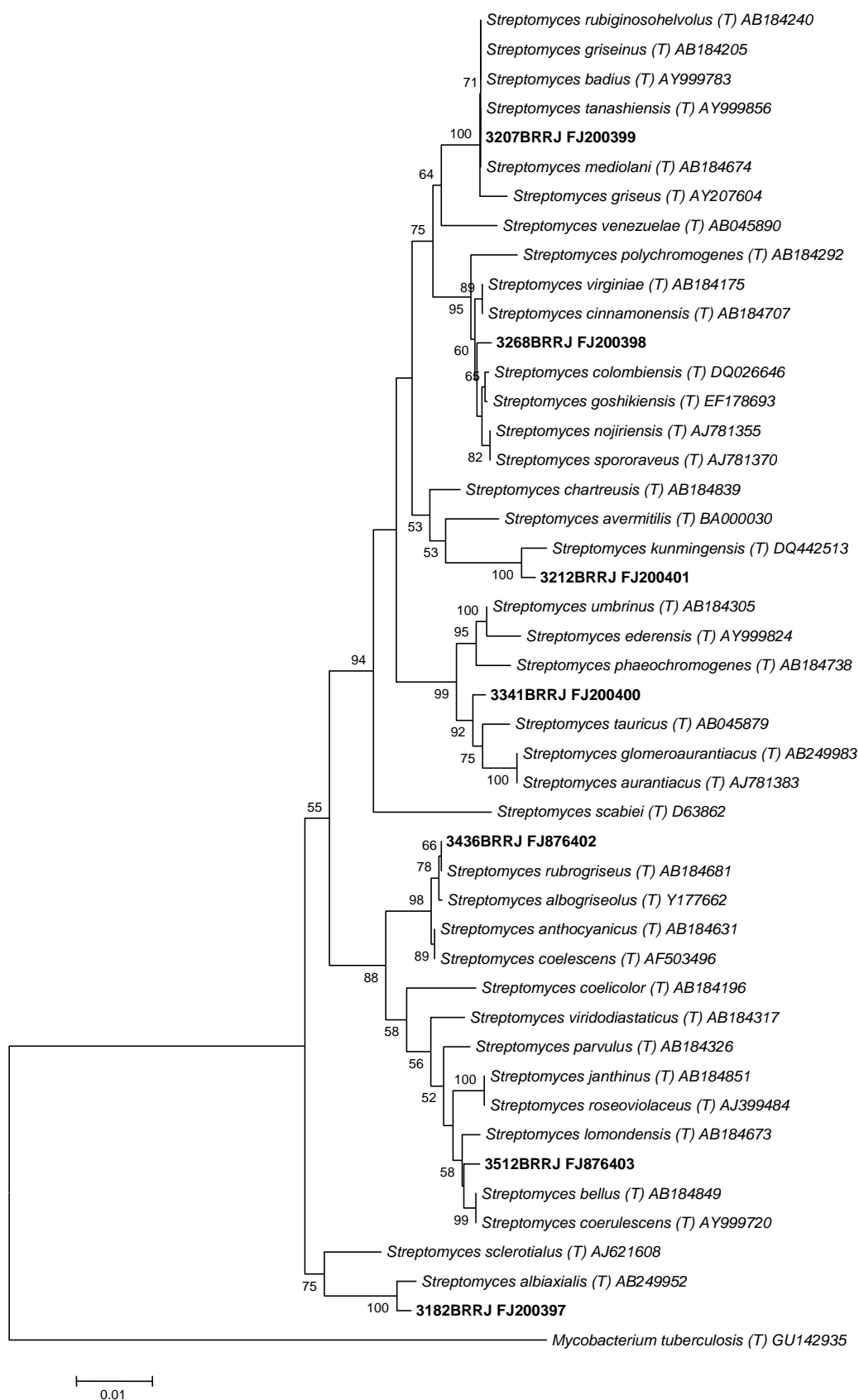


Figure 5. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using 16S rRNA gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Mycobacterium tuberculosis* (T) GU142935 sequence was used as an outgroup.



Figure 6. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using *gyrB* gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Mycobacterium tuberculosis* JQ684011 sequence was used as an outgroup.

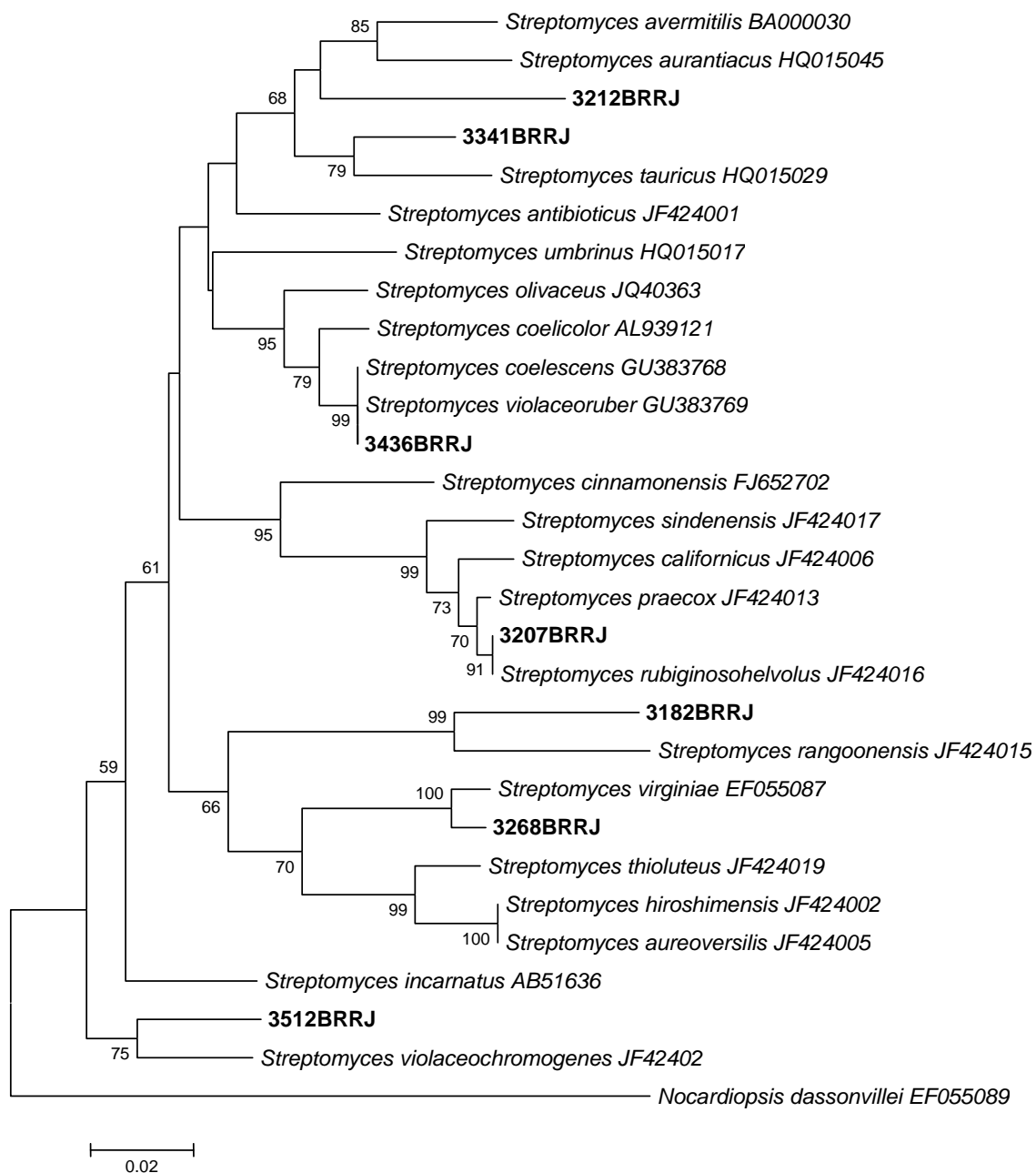


Figure 7. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using *rpoB* gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Nocardioopsis dassonvillei* EF055089 sequence was used as an outgroup.

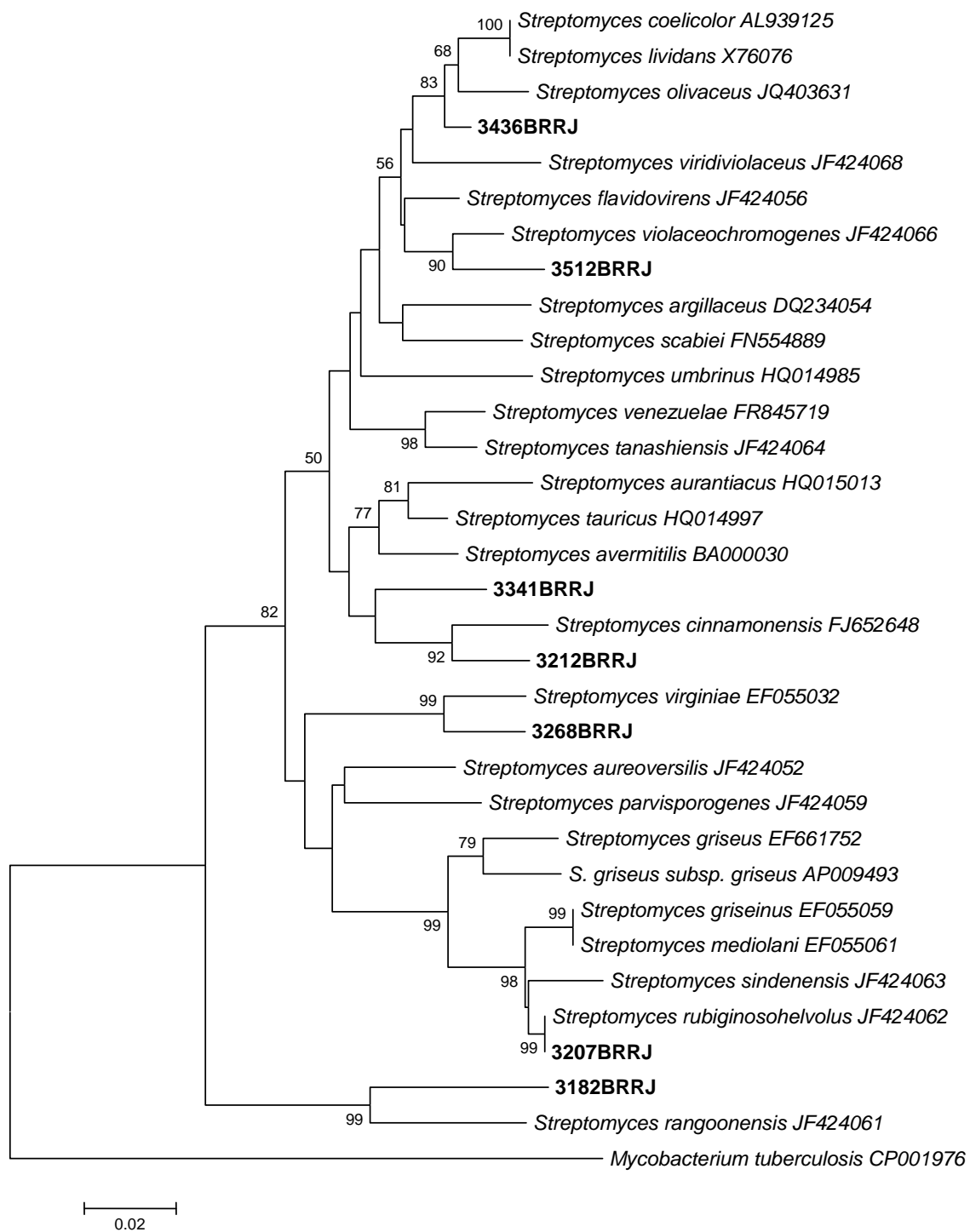


Figure 8. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using *recA* gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Mycobacterium tuberculosis* CP001976 sequence was used as an outgroup.

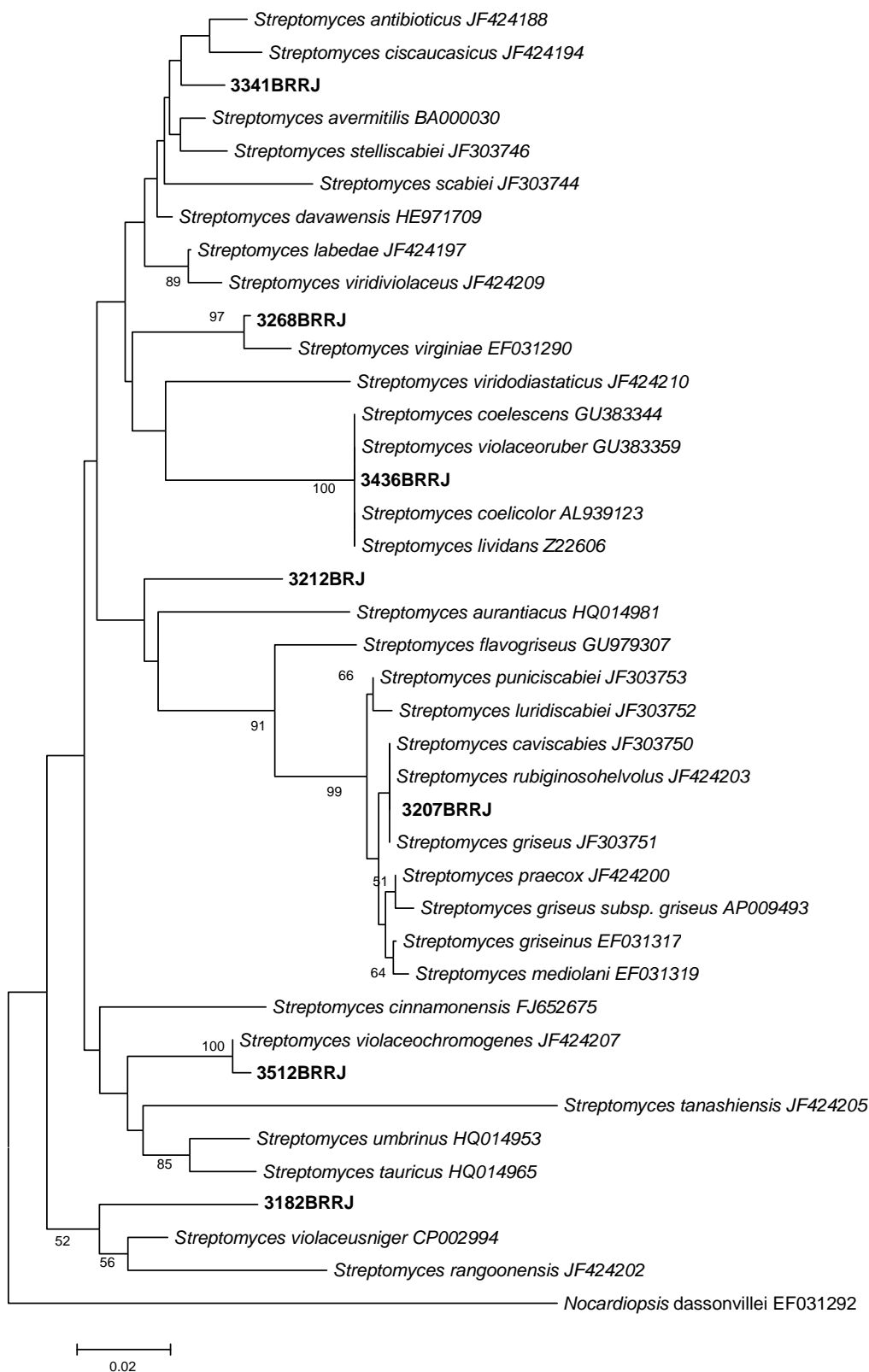


Figure 9. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using *atpD* gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Nocardioopsis dassonvillei* EF031292 sequence was used as an outgroup.

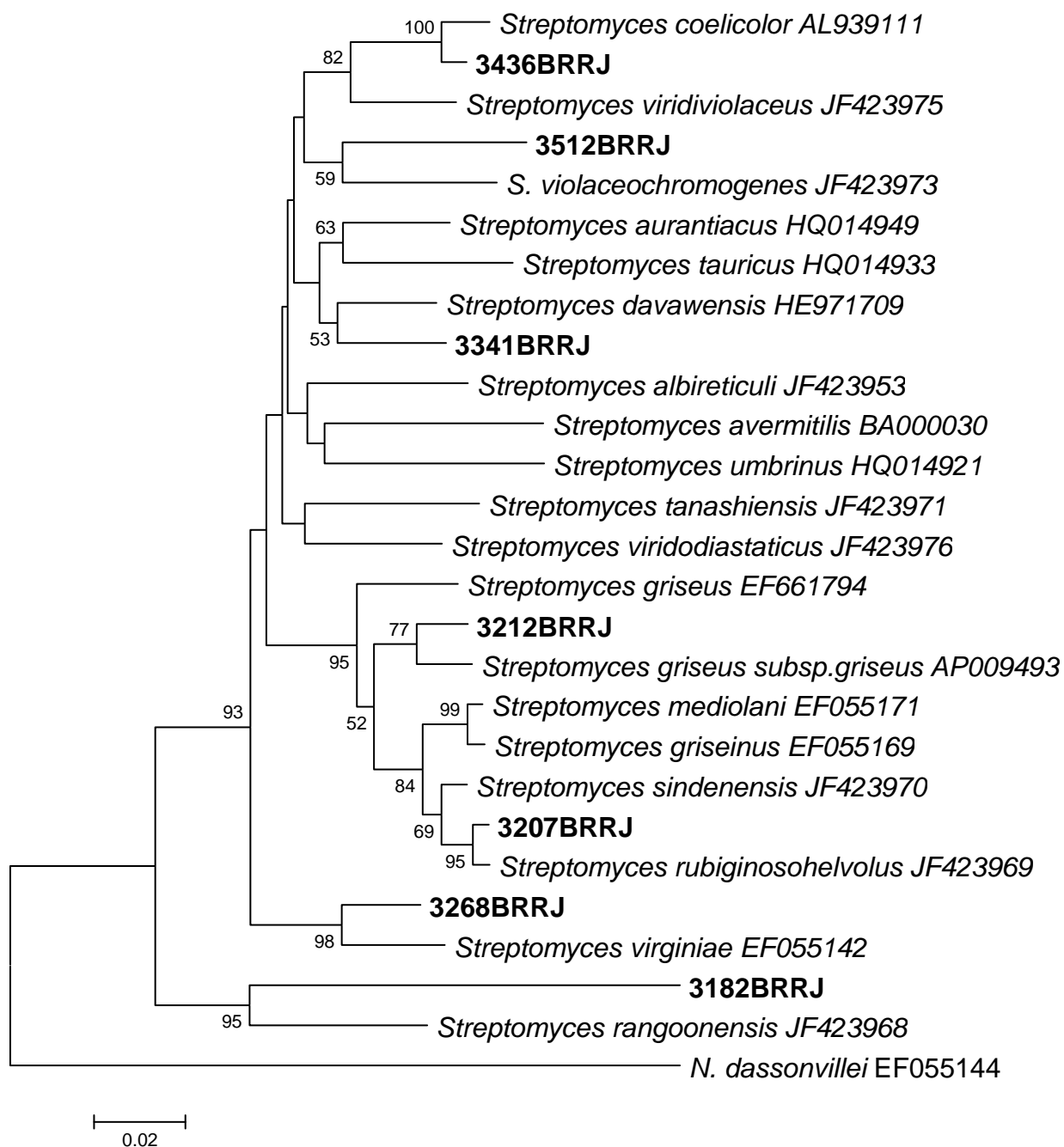


Figure 10. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using *trpB* gene sequences. Distance estimations were calculated by using the Kimura two-parameter model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Nocardiopsis dassonvillei* EF055144 sequence was used as an outgroup.

3.4 Artigo científico - *Guaraldella brasiliensis* sp. nov. and *Nocardioides brasiliensis* sp. nov., isolated from clean room environments.

***Guaraldella brasiliensis* sp. nov. and *Nocardioides brasiliensis* sp. nov., isolated from clean room environments.**

Autores: Paulo Victor Pereira Baio, Koko Otsuki, João Flávio Carneiro Veras, Juliana Nunes Ramos, Livia Maria Rubem Vidal, Raphael Hirata Júnior, Ana Luiza Mattos-Guaraldi; Verônica Viana Vieira.

Revista: (Em fase final de redação)

RESUMO

Os bastonetes Gram positivos irregulares designados como cepas 3117BRRJ, 3712BRRJ e 3371BRRJ foram isolados de ambientes de sala limpa onde os testes de esterilidade em produtos farmacêuticos são realizadas pelo Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS / FIOCRUZ) e todas elas não puderam ser identificadas por critérios convencionais e a sua posição taxonômica foi investigada através de uma abordagem polifásica. Este estudo permitiu-nos encontrar um novo gênero e espécie de algumas estirpes pertencentes à classe Actinobacteria. A análise filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA indicou que a cepa 3117BRRJ pertence ao gênero *Nocardioides* da família *Nocardioideaceae*. A cepa 3117BRRJ foi mais relacionada com a cepa tipo *Nocardioides alkalitolerans* cepa KSL-1 (96,72% de similaridade com a sequência do gene 16S rRNA). As cepas 3712BRRJ e 3371BRRJ apresentaram um valor de similaridade de 94,50% com a sequência deste gene com todas as bactérias conhecidas e apresentou em sua análise filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA grupos isolados com alto valor de suporte de “bootstrap” indicando uma boa distância das outras espécies que se apresentaram mais similares na comparação com essa amostra. Com base nos dados morfológicos, genotípicos e

bioquímicos apresentados neste estudo, a cepa 3117BRRJ representa uma nova espécie do género *Nocardioides*, para o qual o nome *Nocardioides brasiliensis* sp. nov. é proposto e as cepas 3712BRRJ e 3371BRRJ devem ser classificadas em um novo género para o qual o nome *Guaraldella* nov. É proposta. A cepa tipo destas amostras foram denominadas como 3117BRRJ, 3712BRRJ e 3371BRRJ.

TITLE PAGE

***Guaraldella brasiliensis* sp. nov. and *Nocardioides brasiliensis* sp. nov., isolated from clean room environments**

Paulo Victor Pereira Baio^{1,2,4}, Koko Otsuki³, João Flávio Carneiro Veras², Juliana Nunes Ramos^{1,2}, Livia Maria Rubem Vidal², Raphael Hirata Júnior¹, Ana Luiza Mattos-Guaraldi¹; Verônica Viana Vieira²

¹ Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance - LDCIC. Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

² National Institute for Quality Control in Health (INCQS). Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

³ Institute Oswaldo Cruz (IOC). Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

⁴ Laboratório Químico e Farmacêutico do Exército, LQFEx, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;\

Correspondence: Verônica Viana Vieira
Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle e Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Avenida Brasil, 4365.
Tel: 552138655186; Fax: 552122900915;
E mail: veronicavianavieira@hotmail.com

Keywords: Irregular Gram positive rods; ***Guaraldella brasiliensis* sp. nov. and *Nocardioides brasiliensis* sp. nov.**; Clean rooms environments; 16S rRNA gene.

Abstract

Irregular Gram positive rod isolates, rod-shaped bacterium, designated 3117BRRJ, 3712BRRJ and 3371BRRJ strains were isolated from clean room environments in which the sterility tests are performed in The National Institute for Quality Control of Health (INCQS/FIOCRUZ), Brazil and all of them could not be identified by conventional criteria and its taxonomic position was investigated by using a polyphasic approach. This study enabled us to find a novel genus and species of some strains belonging to the *Actinobacteria* class. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences indicated that 3117BRRJ strain belongs to the genus *Nocardioides* in the family *Nocardioideaceae*. The 3117BRRJ strain was related most closely to *Nocardioides alkalitolerans* (T) strain KSL-1 (96.72% 16S rRNA gene sequence similarity). The 3712BRRJ and 3371BRRJ strains had less than 94.50% sequence identity with any known bacteria and they presented in their phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences isolated cluster with high bootstrap support value indicating good distance from others species. Based on the morphological, genotypic and biochemical data presented in this study the 3117BRRJ strain represent a novel specie of the genus *Nocardioides*, for which the name *Nocardioides brasiliensis* sp. nov. is proposed and the 3712BRRJ and 3371BRRJ should be classified in a new genus for which the name *Guaraldella* nov. is proposed. The type strain is 3117BRRJ, 3712BRRJ and 3371BRRJ.

Introduction

The Actinobacteria constitutes one of the main phyla within the Bacteria (Ludwig & Klenk, 2001). Many studies describe the difficulty of identifying several bacterial clusters, such as bacteria belonging of this class as the aerobic Gram positive

rods by phenotypic methods (Drancourt *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2004).

We conducted phylogenetic, phenotypic, and genotypic analyses to determine the taxonomic position of the three unidentifiable contaminants strains isolated from clean room environment in which the sterility tests are performed at The National Institute for Quality Control of Health (INCQS/FIOCRUZ).

This study enabled us to find a novel genus belonging to the *Propionibacteriaceae* family and species belonging to the *Nocardioidaceae* family.

Materials and methods

Bacterial isolates. A total of three irregular Gram positive rods isolates unidentifiable by phenotypic methodology, were included in this approach and are listed in Table 1. They were subjected to an extensive phenotypic investigation by conventional biochemical methods (Conville & Witebsky, 2011; Funke & Bernard, 2011) and were also evaluated by API Coryne system version 2.0 (BioMerieux).

Nucleic acid extraction, 16S rRNA gene amplification and sequencing. Each isolate was grown in BHI (Brain Heart Infusion) broth by incubation for 24/48 h at 30°C and centrifuged for 5 min at 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415 C). The supernatant was discarded by aspiration, and the pelleted were resuspended in 500 µL of sterile MILLI-Q water and subsequently boiled in a water bath for 15 min for DNA extraction. Cell extracts were then immediately stored at -20°C for use in PCR reactions. Extracted DNA was amplified by PCR in a 50 µl reaction. The PCR reaction mixture contained

sterile distilled water, PCR buffer (eppendorf), 3.0 mM MgCl₂ (eppendorf), 1.5 U of Taq polymerase (eppendorf), 10 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP/eppendorf), 3 µl of the DNA extract and 150 ng of each primer (pA and pH). Two pairs of primers were used in the study: the universal primers pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) as well as 1831 (5'-GAGGAACACCGATGGCGAAGGC) and 1832 (5'-GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT) (Invitrogen Custom Primers – Invitrogen Brazil Ltda) GGTGATCCAGCCGCA-3', as described by Watts *et al.* (2000). Amplification conditions included an initial denaturing for 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 2 min at 72°C, and a final extension for 7 min at 72°C and were performed on a thermal cycler (GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler – Applied Biosystems-USA). A single PCR product of approximately 1.5 kb was obtained and purified using the Perfectprep gel Cleanup Kit (Eppendorf) in accordance with the supplier's instructions. The purified PCR product was sequenced in both directions by primer walking with the oligonucleotides describe above. The sequencing reactions were performed with BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 377 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems DNA sequencer, Darmstadt, Germany) by standard protocols. 16S rRNA gene sequences were compared to those available in the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST algorithm and the Ribosomal Data-base Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>). The 16S rRNA gene sequences from isolates have been deposited in the EMBL/GenBank database under the accession numbers presented in Table 1.

Phylogenetic analysis.

The 16S rRNA gene sequences were aligned by CLUSTALX (Thompson et al. 1997). The unmatched ends of each gene sequence alignment were deleted in order to create a homogeneous matrix. The phylogenetic trees were constructed by using neighbour-joining genetic distance method and they were made by using the program MEGA 4.0 package with the option of complete deletion of gaps (Tamura et al. 2007). We use the p distance model for all NJ tree constructions after compute pairwise distance and the overall average was 0.078, which indicated a low percentage of difference in our alignment. The reliability of each tree topology was checked by 1000 bootstrap replications.

Results and Discussion

The 3712BRRJ and 3371BRRJ strains showed oxidase positive, colony colour orange, non motility, nitrat not reduced to nitrite, hydrolysis of aesculin, casein, gelatin and DNase were negative but starch was positive. Enzyme activities were positive to PYZ, PyrA, β -Galactosidase, α -Glucosidase and β -NAG and were negative to Pal and β -GUR. The 3117BRRJ strain showed oxidase negative, colony colour white, non motility, nitrat not reduced to nitrite, hydrolysis of aesculin and starch were negative but casein, gelatin and DNase were positive. Enzyme activities were positive to PYZ, PyrA, Pal, α -Glucosidase and β -NAG, and were negative to β -GUR and β -Galactosidase.

All of the strains were aerobic, Gram-positive rods and catalase-positive, optimal growth conditions at 25-30°C of temperature and pH 6.0-7.0. None of our

studied strains utilize lactose, mannoside, trehalose, arginine, sucrose, maltose, mannitol, xylose, fructose, galactose, glucose and raffinose, as carbon and energy sources.

In this study, almost complete 16S rRNA sequences were obtained for all isolates, which could not be assigned to a genus by conventional identification procedures, and their sequences were made available for comparison (Table 1). Two isolates could not be identified at the genus level and the remaining isolate could not be identified to the species level by this method. The isolate 3117BRRJ showed only 97.03% of its sequence is similar to the *Nocardioides alkalitolerans* (T) strain KSL-1 (Accession no. AY633969), this isolate was reported as belonging to the *Nocardioides* sp (Table 1).

The 3712BRRJ and 3371BRRJ isolates showed 92.80 to 94.37% 16S rRNA sequence similarity to several species from families within the *Propionibacterineae* suborder (Table 1). The 16S rRNA gene sequences of these two strains were identical and were isolated in different years.

Similar tree topology was found in the tree generated with the maximumlikelihood algorithm (data not shown). The phylogenetic analysis (Fig. 1) suggests, that our 3117BRRJ strain is associated to *Nocardioides spp.* clade and we consider more appropriate to describe the organism we characterized as a novel species of *Nocardioides*. Levels of 16S rRNA gene sequence similarity between the 3117BRRJ strain and the type strains of all *Nocardioides* species with validly published names ranged from 93.99% (with *Nocardioides kongjuensis*) to 96.72% (with *Nocardioides alkalitolerans*).

As shown in the phylogenetic tree based on the neighbor joining algorithm, the 3712BRRJ and 3371BRRJ strains formed a distinct evolutionary lineage within the

radiation of the cluster comprising different genus (Fig. 1). The levels of 16S rRNA gene sequence similarity were more similar to a different genus and ranged from 91.59% to 94.39% for *Luteococcus japonicus* to *Microlunatus phosphovorus* respectively (Table-1). It is worth mentioning that the more similar genus to our strains 3712BRRJ and 3371BRRJ were relatively described in recent years (Euzéby, 2011).

It was suggested that the experiments of DNA-DNA hybridization is only performed for strains that share a value less than 98.7% similarity with the 16S rRNA gene sequence analysis in order to reduce workload involved with this kind of experiments (Stackebrandt & Ebers, 2006). As our values of the 16S rRNA gene sequence similarity for all strains studied was less than 96.8% with the most similar results with known bacteria found in the databases consulted (Table 1), we have not made the experiments of DNA-DNA reassociation.

Based on the morphological, genotypic and biochemical data presented in this study, the strain 3117BRRJ should be classified as a novel species, for which the name *Nocardioides brasiliensis* sp. nov. is proposed, and the other two strains: 3712BRRJ (accession number:FJ200393) and 3371BRRJ (accession number: FJ872522) should be classified in a new genus for which the name *Guaraldella* nov. is proposed.

Table 1 - 16S rRNA-based identification of 03 phenotypically unidentified bacterial isolates

16S rRNA-based identification	pb	Isolate Number/ GenBank Accession no.	Closet match ^a	Reference sequence (Accession no.)	Similarity (%)
<i>Nocardioides sp.</i>	1494	3117BRRJ/FJ200392	<i>Nocardioides alkalitolerans</i> (T)	AY633969	97.03
<i>Propionibacterinae</i>	1501	3712BRRJ/FJ200393	<i>Microlunatus phosphovorius</i> (T)	Z78207	94.31
			<i>Propionicicella superfundia</i> (T)	DQ176646	93.77
			<i>Luteococcus peritonei</i> (T)	AJ132334	93.65
			<i>Propionicimonas paludicola</i> (T)	AB078858	93.61
			<i>Propioniferax innocua</i> (T)	AF227165	93.16
			<i>Friedmanniella lucida</i> (T)	AB445454	92.80
<i>Propionibacterinae</i>	1491	3771BRRJ/FJ872522	<i>Microlunatus phosphovorius</i> (T)	Z78207	94.37
			<i>Propionicicella superfundia</i> (T)	DQ176646	93.83
			<i>Luteococcus peritonei</i> (T)	AJ132334	93.72
			<i>Propionicimonas paludicola</i> (T)	AB078858	93.68
			<i>Propioniferax innocua</i> (T)	AF227165	93.22
			<i>Friedmanniella lucida</i> (T)	AB445454	92.87

^a From comparison with the GenBank and RDP II database (Jan 2013)

^b(T) Type strain

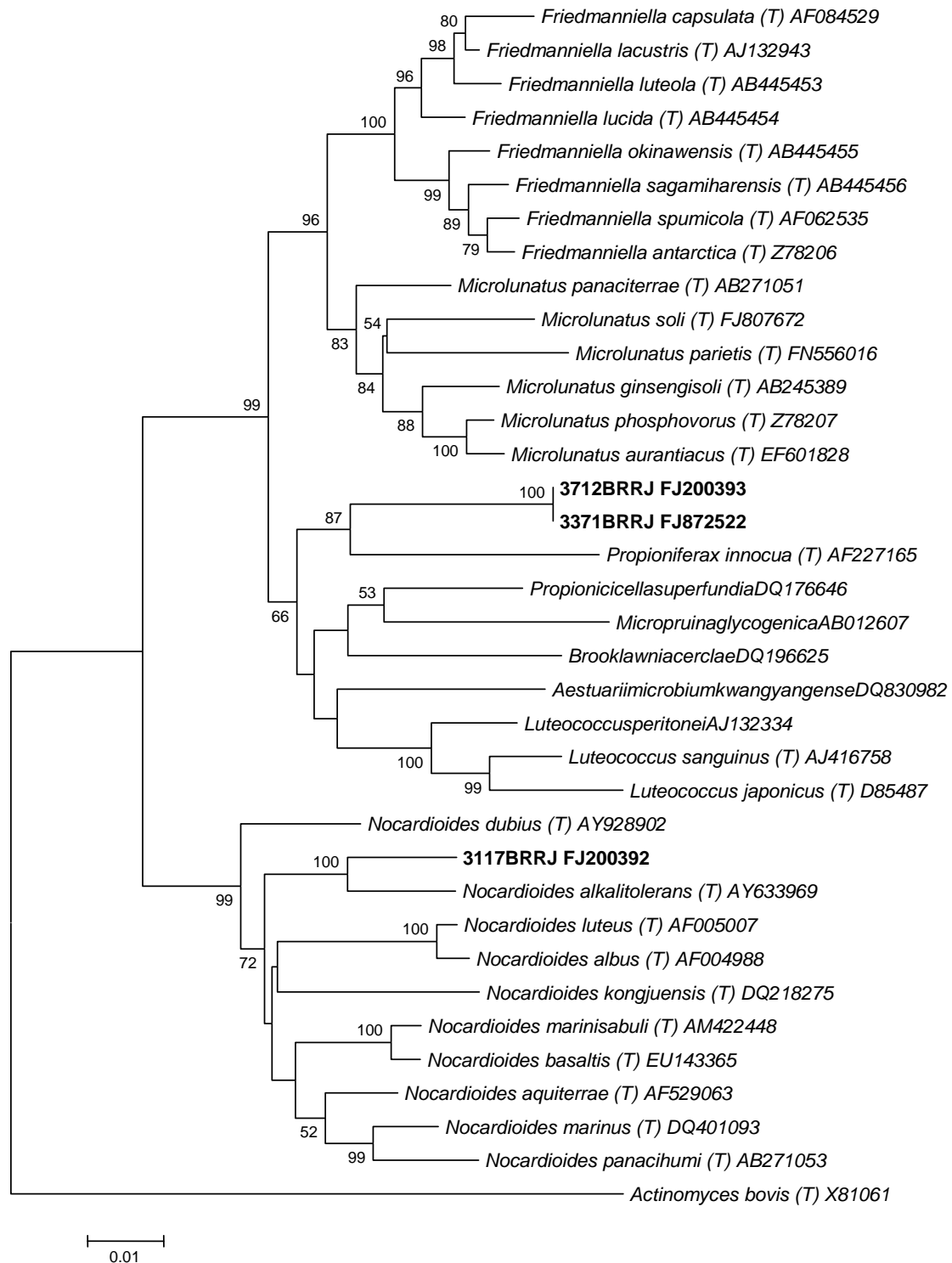


Fig 1 - Phylogenetic tree based on neighbor-joining method using 16S rRNA, gene sequences. Distance estimations were calculated by using p distance model. Bootstrap percentages after 1,000 simulations are shown. The *Actinomyces bovis* (T) X81061 sequence was used as an outgroup.

Table 2 - Phenotypic characteristics of strains studied

Characteristics	Strains		
	3712BRRJ	3371BRRJ	3117BRRJ
Colony colour	orange	orange	white
Shape	rod	rod	rod
Motility	negative	negative	negative
Optimal growth conditions:			
Temperature (°C)	25-30	25-30	25-30
pH	6.0-7.0	6.0-7.0	6.0-7.0
NaCl (%)	ND	ND	0-2.5
Oxidase	positive	positive	negative
Nitrate reduction to nitrite	negative	negative	negative
Hydrolysis of:			
Aesculin	negative	negative	negative
Casein	negative	negative	positive
Gelatin	negative	negative	positive
Starch	positive	positive	negative
DNase	negative	negative	positive
Enzyme activities:			
Pyz	positive	positive	positive
PyrA	positive	positive	positive
Pal	negative	negative	positive
β-Gur	negative	negative	negative
β-Galactosidase	positive	positive	negative
α- Glucosidase	positive	positive	positive
β-Nag	positive	positive	positive

ND = not determineted

Description of *Guaraldella* gen. nov. and *Guaraldella brasiliensis* sp. nov.

Guaraldella genus (Tribute to Ana Luiza de Mattos-Guaraldi). Cells are Gram-positive, aerobic, non motility, non-spore-forming rods in the exponential phase of growth. Colonies are circular, smooth, glistening, convex, and orange in colour. Optimal temperature for growth is 25–30 °C. Does not utilize lactose, mannoside, trehalose, arginine, sucrose, maltose, mannitol, xylose, fructose, galactose, glucose and raffinose, as carbon and energy sources. Oxidase positive, nitrate not reduced to nitrite, hydrolysis of aesculin, casein, gelatin and DNase were negative but starch was positive. Enzyme activities were positive to PYZ, PyrA, β-Galactosidase, α-Glucosidase and β-NAG and were negative to Pal and β-GUR. The

type strain, 3712BRRJ (accession number: FJ200393) and 3371BRRJ (accession number: FJ872522) was isolated from a clean room environment. These strains should be classified as a novel specie, for which the name *Guaraldella brasiliensis* sp. nov. is proposed.

Description of *Nocardioides brasiliensis* sp. nov.

Nocardioides brasiliensis. Cells are aerobic, non motility, non-spore-forming rods in the exponential phase of growth. Gram-positive but Gram variable in old cultures. Colonies are circular, smooth, glistening, convex, milky-white in colour. Neither metabolite nor aerial mycelia are formed. Optimal temperature for growth is 25–30 °C. Does not utilize lactose, mannoside, trehalose, arginine, sucrose, maltose, mannitol, xylose, fructose, galactose, glucose and raffinose, as carbon and energy sources. Oxidase negative, nitrate not reduced to nitrite, hydrolysis of aesculin and starch were negative but casein, gelatin and DNase were positive. Enzyme activities were positive to PYZ, PyrA, Pal, α -Glucosidase and β -NAG, and were negative to β -GUR and β -Galactosidase. The type strain, 3117BRRJ (accession number: FJ200392) was isolated from clean room environment. The strain 3117BRRJ should be classified as a novel specie, for which the name *Nocardioides brasiliensis* sp. nov. is proposed.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) under award number E 26/210-479/2007. We thank the PDTIS/FIOCRUZ genomic plataform for sequencing.

References

- Conville P. S., Witebsky F. *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces, and Other Aerobic Actinomycetes*. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th. Ed. ASM Press, Washington. D. C, 2011.
- Cundell AM. Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. *PDA J Pharm Sci Technol* 2006; 60: 111-123.
- European Pharmacopoeia. Sterility. In: Council of Europe, editors. *European Pharmacopoeia 6.0*. Strasbourg: Council of Europe; 2008; p. 155-159.
- Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral J-P, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3623–3630.
- Drancourt M, Berger P, Raoult D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2197-2202.
- Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1997; 47: 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>).
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39:783-791.
- Funke, G; Bernard, K. A. (2011). Coryneform Gram-Positive Rods. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th. Ed. ASM Press, Washington. D. C.
- Halls N. Microbiological environmental monitoring. In: Halls N, editor. *Microbial contamination control in pharmaceutical clean rooms*. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 23-51.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*; 1980; 16:111–120.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 2004; 5:150–163.
- La Duc MT, Dekas A, Osman S, Moissl C, Newcombe D, Venkateswaran K. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl Environ Microbiol*; 2007; 73: 2600–2611.
- Ludwig W & Klenk, H.-P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*,. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer. 2001; 2nd ed, 1: 49–65.

Moissl C, Osman S, La Duc MT, Dekas A, Brodie E, DeSantis T, Venkateswaran K. Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 61: 509–521.

Nagarkar PP, Ravetkar SD, Watve MG. Oligophilic bacteria as tools to monitor aseptic pharmaceutical production units. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1371–1374.

Patel JB, Wallace Jr RJ, Brown-Elliott BA, Taylor T, Imperatrice C, Leonard DGB, Wilson RW, Mann L, Jost KC, Nachamkin I. Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2530–2540.

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

Stackebrandt E and Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*, 2006; 33:152–155.

Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1997; 47: 479–491.

Sutton SVW and Cundell AM. Microbial identification in the pharmaceutical industry. *Pharmacop Forum* 2004; 30: 1884-1894.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24:1596–1599.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876–4882.

Tang Y-W, von Graevenitz A, Waddington MG, Hopkins MK, Smith DH, Li H, Kolbert CP, Montgomery SO, Persing DH. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1676-1678.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876–4882.

Venkateswaran K, Satomi M, Chung S, Kern R, Koukol R, Basic C, White D. Molecular microbial diversity of a spacecraft assembly facility. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24: 311–320.

Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbach S. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci* 2000; 83:2373-2379.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo analisamos cepas de BGPI e dos Actinomicetos aeróbios de origem ambientais e clínicos os quais foram submetidos à caracterização, ou seja, investigação utilizando metodologia de análise fenotípica e molecular.

As cepas de origem clínica investigados foram os pertencentes aos gêneros *Corynebacterium* e *Nocardia* que não puderam ser identificados ao nível de espécie por metodologia fenotípica. Para essas cepas empregamos a análise dos genes conservados 16S rRNA e *rpoB* e os genes 16S RNA, *secA1*, *hsp65* e *gyrB* respectivamente.

Com relação às cepas de origem ambiental que não foram identificadas por metodologia fenotípica, inúmeros gêneros foram identificados utilizando a análise do gene 16S rRNA não sendo possível concluir a identificação de duas destas cepas por terem apresentado valor baixo de similaridade com esse gene com diferentes gêneros. Os microorganismos ambientais que foram mais isolados corresponderam ao gênero *Microbacterium* os quais foram submetidos à análise dos genes conservados 16S rRNA, *recA* e *rpoB* e cepas pertencentes ao gênero *Streptomyces* os quais procedemos a Análise da Sequência Multilocus (MLSA) utilizando os genes 16S rRNA, *recA*, *rpoB*, *gyrB*, *atpD* e *trpB*.

A metodologia genotípica foi eficaz na identificação das cepas clínicas quanto a conclusão ao nível de espécie ao contrário das cepas ambientais que na sua grande maioria permaneceram inconclusivas suas identificações por ausência de depósitos dos outros genes nos bancos de dados consultados para as espécies que se apresentaram mais similares com nossas cepas com similaridade superior ao valor proposto por Stackebrandt e Ebers (2006) de 98,7% com mais de uma espécie do gênero na similaridade com a análise do gene 16S rRNA.

Quanto às cepas identificadas como pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, documentamos neste estudo um surto nosocomial que incluiu casos fatais de infecção sistêmica causada por *C. striatum* em um hospital de 600 leitos, no Rio de Janeiro. Análise de PFGE de 15 cepas de *C. striatum* indicou a presença de quatro perfis de PFGE, incluindo dois clones relacionados com cepas apresentando resistência múltipla aos antimicrobianos (MDR) (PFGE I e II). Os nossos dados demonstram a predominância de PFGE tipo I, de 11 cepas MDR que foram obtidos na maior parte das enfermarias e UTI cirúrgica. As amostras de secreção traqueal foram provenientes de pacientes associados à ventilação mecânica com colonização do trato respiratório ou pneumonia e foram a maioria (6 de 7) PFGE tipo I.

A possibilidade de uma ligação de causalidade entre a morte e a infecção por *C. striatum*. (PFGE tipos I e II), foi observada em cinco ocasiões. Similar aos nossos resultados,

estudos anteriores também revelaram que o suporte ventilatório é um fator de risco relevante para a aquisição de infecção por *C. striatum* (Brandenburg et al, 1996; Campanile et al, 2009; Wong et al, 2010).

Pesquisas de infecções causadas por bactérias corineformes em pacientes pediátricos oncológicos no hospital de pesquisa St. Jude Children's Research Hospital (Tennessee, EUA), indicou que a maioria dos casos foram devido a bacteremia por *C. striatum*. Estes pacientes tiveram complicações relacionadas com as infecções, incluindo infecções recorrentes e artrite séptica (Adderson et al, 2008). No presente estudo, as amostras de *C. striatum* não foram isoladas de crianças, de recém-nascidos e nem de portadores de câncer. O referido patógeno foi isolado de adultos, sendo metade dos pacientes (n= 7) com 50 ou mais anos de idade. O isolado de *C. striatum* apresentou-se puro com bom crescimento e ausência de outros patógenos que junto com a deterioração clínica, forneceu forte evidência da sua patogenicidade nos nossos pacientes. No entanto, não foi possível distinguir entre os óbitos atribuídos as infecções por *C. striatum* e pelas doenças de base apresentadas pelos pacientes.

Exceto pela invariável atividade da vancomicina contra corinebacterias, a variabilidade da resistência a outras classes de agentes antimicrobianos enfatiza a necessidade de vigilância contínua dos seus padrões de resistência. Embora a maioria dos relatos de cepas de *C. striatum* foram susceptíveis a uma ampla gama de antibióticos (Martinez-Martinez et al, 1995, 1996, Weiss et al, 1996), foi sugerido que a pressão seletiva exercida pelo tratamento antimicrobiano prévio favorece o crescimento excessivo de *C. striatum* como um colonizador secundário em pacientes imunodeficientes. Nesse contexto, o surgimento de cepas MDR é particularmente preocupante (Leonard et al, 1994, Campanile et al, 2009). Aqui, o fenótipo MDR de cepas de *C. striatum* foi imediatamente observado e foi responsável pelo alarme que levou à vigilância laboratorial posterior dessas cepas. A maioria (87%) das cepas de *C. striatum* só foi sensível à vancomicina, linezolida e tetraciclina.

No Japão, Otsuka e colaboradores (2006) relataram taxas variáveis de suscetibilidade de *C. striatum* para β -lactâmicos e aminoglicosídeos, com altos níveis de resistência a eritromicina, tetraciclina, rifampicina e ciprofloxacina, apesar de todas as cepas serem sensíveis à vancomicina. Procedimentos de PFGE identificaram 14 padrões de *C. striatum*, com os tipos A, D e E associados a surtos nosocomiais de origem respiratória e com subtipos A1, A2, D2 e E associados com a resistência a uma vasta gama de antibióticos.

Além disso, Renom e colaboradores (2007) observaram em suas amostras que o critério de resistência a múltiplas drogas (resistência a três ou mais antibióticos de diferentes famílias), aplicado a 100% das cepas isoladas em surtos nosocomiais, dos quais 65% foram

resistentes a quatro ou cinco grupos diferentes de antibióticos, 6,9% foram sensíveis apenas ao imipenem e vancomicina e 11% foram sensíveis apenas à vancomicina. De acordo com os padrões de sensibilidade obtidos por Otsuka e colaboradores (2006), observamos nas amostras que o critério de multirresistência (resistência a três ou mais antibióticos de diferentes famílias) se aplicou a 87% de cepas de *C. striatum* (PFGE tipos I e II) cepas no surto nosocomial atual.

Para o *C. striatum*, não existe nenhuma base de dados pública disponíveis, tal como o PulseNet (cdc.gov/PulseNet), para permitir a comparação de padrões de PFGE observados nos diferentes surtos nosocomiais. Campanile e colaboradores (2009) observaram que os perfis de *SwaI*-PFGE exibem *C. striatum* que variam em tamanho de 48,5-533,5kb. Em nosso estudo, obtivemos perfis de *SwaI*-PFGE com faixas que variam em tamanho de mais de 97,0-533,5kb.

A ausência de bandas que variam em tamanho de 48,5-97,0 kb sugere que as cepas de MDR de *C. striatum* isolados neste surto nosocomial no Brasil foram diferentes daqueles isolados na Itália por Campanile e outros (2009). Além disso, análise dos perfis das características fenotípicas de *C. striatum* indicou que as estirpes brasileiras foram diferentes daquelas isoladas na Holanda (biotipo: nitrato/Pyz-positivo e sacarose negativo; código API 3.100.104) (Brandenburg et al, 1996.).

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro surto hospitalar brasileiro causado por cepa MDR de *C. striatum* descrito na literatura. Com o auxílio de técnicas de PFGE, a natureza clonal das cepas dos surtos foi estabelecida, apesar de uma fonte comum, e o modo de transmissão não ter sido determinada. Os achados também destacam a importância do *C. striatum* como um emergente patógeno MDR nosocomial mundial de diferentes clones podem ser responsáveis por estes surtos nosocomiais.

As cepas identificadas como pertencentes ao gênero *Nocardia* foram provenientes de diferentes sítios clínicos representativos. Diagnóstico bacteriológico definitivo de nocardiose depende do isolamento e identificação do agente causal a partir de material clínico e de laboratório em que são analisadas as amostras. O crescimento em meio de cultura de espécies de *Nocardia* é lento e a incubação deve ser continuada por pelo menos duas semanas (Clark, 2009; Conville & Witebsky, 2011). A interrupção prematura da cultura diminui a sensibilidade de recuperação e pode contribuir para subestimar a verdadeira incidência de nocardioses. A maioria dos laboratórios descartam as culturas bacterianas que são negativas, após 48 h, e laboratórios especializados em *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose) não

processam amostras de expectoração sem descontaminar patógenos pulmonares que não sejam micobactérias (Agterof et al, 2007; Alnaum et al, 2011).

Além disso, a coloração ácido-resistente modificada (Kinyoun) e a de Gram de espécimes são particularmente importantes para proporcionar um diagnóstico rápido, econômico e presuntivo enquanto se aguardam os resultados da cultura (Pelleg, 2007; Clark, 2009). Ao contrário das micobactérias, os *Actinomyces* podem ser mais facilmente diferenciados de *Nocardia*, pois eles não são corados pela coloração ácido-resistente modificada (Brown-Elliott et al, 2006; Ambrosioni et al, 2010; Sullivan e Chapman, 2010; Savini et al, 2012).

De acordo com Kiska e colaboradores (2002), nenhum método característico pode identificar todas as cepas de *Nocardia* ao nível de espécie. Nessa ocasião, uma combinação padrão de susceptibilidade a antimicrobianos, pigmento da colônia e um grupo de testes bioquímicos foram sugeridos para identificar com precisão todas as amostras ao nível de espécie. No entanto, estudos mais recentes revelaram que a especiação de *Nocardia* pode exigir a confirmação por meio de técnicas moleculares, que podem mudar a identificação bioquímica inicial (Brown-Elliott et al 2008; Ambrosioni 2010; Liu et al 2011). Assim, vários métodos moleculares têm sido propostos para uma identificação precisa de espécies de *Nocardia* (Conville & Witebsky, 2007; McTaggart et al, 2010; Tan et al, 2010).

A análise da sequência do gene 16S rRNA realizados por Liu e colaboradores (2011) mostrou que os ensaios de identificação fenotípica produziram 37% de erros na identificação de espécies de *Nocardia*. Embora a sequência do gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizada para discriminar as espécies de *Nocardia*, erros de identificação de microorganismos podem ocorrer devido à alta similaridade da sequência e múltiplas, mas diferentes cópias deste gene (Conville & Witebsky, 2005). Na tentativa de melhorar a identificação devido ao aumento do número de espécies do gênero *Nocardia*, a análise de outros genes conservados, tais como o gene de 65-kDa da proteína do choque térmico (*hsp65*), proteína A essencial secretora (*secA1*) e girase B (*gyrB*) foi também realizada (Conville et al, 2006; Yin et al, 2007; McTaggart et al, 2010; Takeda et al, 2010; Kong et al, 2010).

A análise da sequência de múltiplos genes conservados (genes “housekeeping”) fornecem locais mais informativos dos nucleotídeos e protege contra os efeitos de distorção de recombinação homóloga e transferência horizontal de genes de um único gene (Gevers, 2005). Neste contexto, a análise da sequência de multilocos (MLSA) tem sido considerada como uma técnica alternativa para a identificação e classificação de um grupo diversificado de bactérias, incluindo o gênero *Nocardia* (McTaggart et al, 2010, Takeda et al, 2012). Pelo

nosso conhecimento, este é o primeiro relato de identificação de espécies de *Nocardia* por MLSA no Brasil.

No Brasil, bem como em outros países em desenvolvimento, a incidência de nocardiose é desconhecida. Na tentativa de reunir alguma informação sobre este problema de saúde pública uma visão geral dos casos brasileiros de nocardiose, excluindo micetomas, é apresentada na Tabela 3 (manuscrito 2). Um total de 25 estudos sobre 46 casos de infecção por *Nocardia* foram encontradas disponíveis na literatura durante o período de 1970 a 2013. Uma grande série de infecções por *Nocardia* que ocorreu entre 1978 e 1998 foi relatado por Chedid e colaboradores (2007). Transplante de órgão foi a condição mais comum nos casos de nocardioses no Brasil antes do advento do tratamento e profilaxia com sulfametoxazol mais trimetopim e da introdução da ciclosporina (Santamaria Sader et al, 1993; Yu et al 2011;. Clark et al 2009;. Kanne et al. de 2011).

Batista e colaboradores (2011) encontraram apenas um caso de nocardiose entre 1046 transplantes de rim e 708 de fígado de pacientes cadastrados em quatro centros brasileiros de diferentes áreas geográficas de 2001 a 2006. Nessas instituições, a profilaxia com cotrimoxazol foi utilizada rotineiramente por seis meses após o transplante e nas situações em que houve um aumento na terapia imunossupressora.

A maioria dos estudos brasileiros indicou a doença pulmonar como a principal apresentação clínica de nocardiose. Em alguns países em desenvolvimento, onde outras doenças pulmonares crônicas, particularmente a tuberculose (TB), são predominantes, a nocardiose pulmonar pode ser mais comum do que é atualmente reconhecida, especialmente em zonas onde a tuberculose é associada ao HIV. Uma das razões para esta ocorrência é que a manifestação pulmonar de nocardiose é muitas vezes confundida com TB (Yildiz et al, 2006). Achados clínicos, radiológicos e histopatológicos não são suficientes para o reconhecimento de nocardioses pulmonares, sugerindo que uma porcentagem considerável de pacientes com sintomas de doença pulmonar crônica poderia estar sofrendo de nocardioses pulmonares (Clark, 2009; Santos et al, 2010).

Em alguns países africanos, onde a tuberculose associada ao HIV ocorre com frequência, há relatos de elevada prevalência de nocardiose (Rasheed & Belay, 2008; Alnaum et al, 2011; Nwuba et al, 2012). Outro problema para o reconhecimento de nocardiose pulmonar refere-se à dificuldade de diagnóstico laboratorial. Alguns autores têm enfatizado que, em regiões onde ocorre a tuberculose associada ao HIV, as cepas de *Nocardia* são perdidas ou erroneamente identificadas em amostras clínicas e é possível que alguns pacientes diagnosticados em baciloscopia negativa para TB pulmonar realmente tenham nocardiose

(Baily et al, 1988; Poowan et al, 1995; Hasheed et al, 2008; Ba-queda et al, 2011; Alnahum et al, 2011; Nwuba et al, 2012).

No Brasil, Jacomelli e colaboradores (2012) investigaram 286 pacientes com suspeita clínica ou radiológica de TB que foram incapazes de produzir escarro ou com baciloscopia negativa. Eles encontraram 7% de infecções causadas por *Pneumocystis*, fungos e *Nocardia*. Em 2011, a incidência da tuberculose no Brasil foi de 37,2/100.000 habitantes, no entanto, existem cidades brasileiras onde a incidência de tuberculose é muito maior que a encontrada na cidade de São Paulo (39,3/100.000), como no Rio de Janeiro (70,7/100.000 habitantes), Porto Alegre (109,2/100.000), Recife (93,2/100.000) e outras cidades (Brasil, 2012, Piller, 2012). Infelizmente, no Brasil, não existem outros estudos sobre aspectos microbiológicos das infecções diagnosticadas como tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa, para que esta abordagem pudesse ser avaliada no país.

O programa de tratamento da AIDS no Brasil tem sido amplamente citada como a maior e mais bem sucedido programa de tratamento de AIDS do mundo. O programa garante o acesso gratuito à terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) para todas as pessoas que vivem com HIV/AIDS que necessitam de tratamento (Lago et al, 2010; Num *et al*, 2011) Isso pode refletir nos poucos casos de nocardiose em pacientes portadores de HIV notificados no Brasil.

Nocardiose pulmonar e disseminada também foram recentemente relatados em pacientes imunocompetentes em diferentes países (Alnaum et al, 2011; Vuotto et al, 2011; Budzik et al, 2012; Hong et al, 2012). Embora frequente na Índia, casos de queratite são relativamente raros em outros países (Lin et al, 2012. Mascarenhas et al, 2012). No Brasil, foram registrados apenas quatro casos de infecção ocular por *Nocardia* (Nascimento et al, 1995; Urbano et al, 2003; Hofling-Lima et al, 2004; Ramos-Esteban, 2007). Micetomas causados por *Nocardia* sp. foram descritos em São Paulo e esporadicamente em outras cidades (Londero et al, 1986; Castro et al, 1993; Saracá et al, 1993; Lopes et al, 1993,1994; Motta et al, 2004; Chedid et al, 2007; Castro & Piquero Casals, 2008; Magalhães et al, 2010; Dresch et al, 2010; Cordeiro et al, 2011).

Espécies de *Nocardia* diferem em suas respostas aos antimicrobianos e testes de susceptibilidade são recomendados para todas as cepas de *Nocardia* clinicamente significativos. No entanto, devido ao lento crescimento dessas bactérias, os clínicos geralmente iniciam empiricamente o tratamento quando estes resultados ainda não estão disponíveis (Minero et al, 2009). O tratamento de nocardiose geralmente é prolongado e é

baseado na administração de sulfametoxazol mais trimetoprim (TMP-SMX) (Brown-Elliott et al, 2006;. Minero et al, 2009; Brown e Moser, 2010; Brown-Elliott et al, 2012).

Para pacientes com doenças graves, os médicos recomendam um regime de três drogas consistindo de TMP-SMX, amicacina e também ceftriaxona ou imipenem, apesar de já existir relato de resistência a esta combinação (Brown-Elliott *et al*, 2006; Ambrosioni *et al*, 2010). Em nosso estudo, 92% das cepas foram sensíveis ao imipenem e 100% sensíveis à amicacina e TMP-SMX. Alguns relatos descrevem altos níveis de resistência à sulfonamida entre inúmeras espécies de *Nocardia* (Uhde et al, 2010;. Tremblay et al, 2011).

No entanto, esses valores foram contestados por Brown-Elliott e colaboradores (2012) que sugeriram que estes resultados podem estar associados a dificuldades na interpretação de laboratório em MICs *in vitro* para TMP-SMX e sulfametoxazol. Hoje em dia, o TMP-SMX continua a ser a droga de escolha para o tratamento de nocardiose e profilaxia contra a infecção por *Nocardia* em pacientes imunocomprometidos (Sullivan e Chapman, 2010; Brown-Elliott et al, 2012; No authors , 2012; Yu, 2011).

Os casos brasileiros relatados indicados na Tabela 3 mostram que a maioria das cepas foram identificadas como *Nocardia* sp. (55,56%). Na presente investigação, o uso de variados algoritmos bioquímicos convencionais descritos por diferentes autores (Kiska *et al*, 2002; Brown & McNeil, 2003; Roth et al, 2003; Wauters et al, 2005; Brown-Elliott et al, 2006; Conville & Witebsky, 2007) levou à identificação incorreta de cinco de sete das cepas brasileiras testadas.

No Brasil, a análise molecular para a identificação de espécies de *Nocardia* foi feito apenas em algumas oportunidades (Brown et al, 1999; Severo et al, 2005; Condas et al, 2012). Em nosso estudo, o sistema de identificação com base na metodologia MLSA foi capaz de diferenciar espécies de *Nocardia* atualmente reconhecidas. Os dados indicaram que todas as cepas de *Nocardia* foram identificadas por análise filogenética com base na sequência dos genes concatenados *gyrB-16S-secA1* e *hsp65* como recomendado por McTaggart e colaboradores (2010).

O MLSA proporcionou a identificação das seguintes espécies: *N. Nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica* e *N. exalbida/gamkensis*. A maioria das espécies foi relacionada com doença pulmonar, exceto para *N. asiatica* que foi isolada a partir de abscesso cerebral. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro relato brasileiro de *N. cyriacigeorgica* isolado de humano. Duas amostras foram identificadas por MLSA como *N. cyriacigeorgica*, incluindo um isolado a partir de um paciente com doença pulmonar. No Brasil, *N. cyriacigeorgica* foi previamente isolada apenas de tanque de leite bovino (Condas et al, 2012). Entretanto a

descrição de isolamento de tanque de leite bovino e de infecção em humanos acusa a circulação de cepas com potencial de causar quadros de nocardiose em humanos e animais.

Observações semelhantes às realizadas por McTaggart e colaboradores (2010), o MLSA não distingue cepas tipo de *N. arthritidis*, *N. gamkensis* e nem *N. exalbida*. Embora a cepa 2042BRRJ tenha parecido mais relacionada com as espécies *N. exalbida* e *N. gamkensis*, ela se agrupou com a *N. arthritidis* suportado por um “bootstrap” de 100%. Enquanto a análise da sequência de genes adicionais podem demarcar estas cepas tipo, não fazê-lo levaria uma extensa avaliação da legitimidade de seu status de espécies. McTaggart e colaboradores (2010) demonstraram que o esquema MLSA revelou dois conjuntos de cepas tipo que não conseguem formar grupos distintos. Um desses conjuntos foi composto por *N. arthritidis* DSM 44731T, *N. gamkensis* DSM 44956T, *N. exalbida* DSM 44883T e sete cepas clínicas formaram um grupamento com suporte de 98% de “bootstrap”.

As cepas de *N. nova* foram recuperadas a partir de três diferentes amostras clínicas (lavado bronco-alveolar, secreção de nódulos e secreção traqueal, respectivamente) em um único paciente. Assim, este pequeno grupo foi investigado, a fim de determinar a relação genética destas cepas usando o método de “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE). Em conformidade com Wilson (2012), independentemente do estado imunológico de um paciente, o isolamento de *Nocardia* a partir do trato respiratório ou outra fonte do corpo não deve ser considerada como um organismo contaminante ou comensal. Sendo assim, surpreendentemente observou-se que o paciente apresentava co-infecção pulmonar por dois clones de *N. nova* e um deles (perfil PFGE B) foi disseminado e também detectado em secreção nodular.

Em resumo, nocardiose é uma infecção rara, caracterizada por uma elevada taxa de mortalidade. Relatos sugerem que há geralmente um atraso no diagnóstico de nocardiose o que é atribuído a dificuldades de diagnóstico clínico, radiológico e microbiológico. A razão mais comum para um requerente estudo de cultura para a detecção de *Nocardia* spp. é que um paciente não respondeu ao tratamento antibacteriano ou anti-TB usual (Bonnet et al, 2007; Minero et al, 2009). Estratégias terapêuticas ideais dependem de identificação rápida e precisa de espécies de *Nocardia*. Neste contexto, os métodos moleculares para identificação, tais como a análise MLSA oferece uma alternativa de economia de tempo com métodos convencionais.

Quarenta e oito amostras bacterianas ambientais foram isoladas de área limpa e produtos farmacêuticos submetidos a ensaios de esterilidade realizados no Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ). Os bastonetes gram-positivos irregulares são comumente designados por “corineformes”, um termo que é utilizado por conveniência, do mesmo modo que o termo "actinomicetos aeróbicos" é uma designação informal de bactérias que pertencem à ordem *Actinomycetales*. Estes organismos demonstram uma grande diversidade fenotípica, enormes heterogeneidades além de pertencerem a diferentes famílias, ordens, classes e filos. Os microbiologistas são frequentemente confrontados com a dificuldade na caracterização fenotípica deste grupo heterogêneo que compromete a identificação precisa destes micro-organismos (Funke & Bernard, 2011; Conville & Witebsky, 2011).

Os bastonetes gram-positivos irregulares e actinomicetos aeróbios são amplamente distribuídos em ecossistemas terrestres e aquáticos de todo o mundo. Neste estudo, relatamos cepas de sala limpa que exibiram similaridade maior que 98,7% com a análise da sequência do gene 16S rRNA de cepas isoladas de diferentes habitats, incluindo ambientes extremos.

Ambientes de salas limpas são construídos para minimizar a contaminação microbiana, contudo, seleciona micro-organismos que toleram agentes de oxidação química, dessecação, e irradiação UV e as espécies "resistentes" sobrevivem e têm o potencial para contaminar a produção farmacêutica. La Duc e colaboradores (2007) demonstraram que não apenas espécies de *Bacillus* formadoras de esporos, mas também numerosas espécies de bactérias "resistentes" consideradas fisiologicamente flexíveis, como os bastonetes gram-positivos irregulares e actinomicetos aeróbios persistem nas condições inóspitas de ambientes de sala limpa.

Identificação por sequenciamento de gene é o método mais preciso para identificar uma grande variedade de bactérias. O gene alvo que é mais amplamente utilizado para a identificação de bactérias é o 16S rRNA (Petti et al, 2007). Neste estudo, sequências quase completas do gene 16S rRNA foram obtidos para todos as 48 cepas que não foram possíveis ser atribuídas um gênero por métodos de identificação convencionais (Tabela 1, 2 e 3).

Onze das 24 cepas (Tabela 1 do manuscrito 3) exibiram similaridade maior que 98,7% com a análise da sequência do gene 16S rRNA com uma única espécie, e, por conseguinte, podemos concluir sua identificação ao nível de espécie. Oito destas 24 cepas exibiram o mesmo valor de similaridade (> 98,7%) com diferentes espécies do gênero e não foi possível completar a identificação dessas cepas ao nível de espécie.

Neste estudo, todas as cepas foram classificadas em 12 gêneros diferentes, pertencentes a 11 famílias, sendo as mais frequentes as famílias *Microbacteriaceae* e *Streptomycetaceae*. Procedemos a análise das sequências dos genes “housekeeping” para os gêneros mais encontrados (*Microbacterium* e *Streptomyces*). Analisamos os genes *rpoB* e *recA* para as amostras de *Microbacterium* e também Análise da Sequência Multilocus (MLSA) usando fragmentos de sequência de cinco genes housekeeping: *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* a sete amostras identificadas como pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

Dezessete amostras identificadas como *Microbacterium* foram também submetidas às análises dos genes *rpoB* e *recA* para se tentar concluir a identificação ao nível de espécie.

O gênero *Microbacterium* é conhecido desde os anos 90. Eles aparecem como bacilos Gram-positivos pequenos, irregulares, catalase positivo, móveis ou não móveis. Eles são frequentemente encontrados no ambiente (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011). Este gênero possui no momento deste estudo, 81 espécies descritas (Euzéby, 2013). O uso da análise da sequência do gene 16S rRNA completou a identificação de cinco amostras ao nível de espécie e depois da análise da sequência do gene *recA* e *rpoB* foram identificados mais três amostras ao nível da espécie. As outras nove amostras permaneceram sem identificação ao nível da espécie pela falta de sequências disponíveis desses genes e algumas dessas amostras são prováveis candidatas a novas espécies pelos dados apresentados, mas precisam de uma análise mais aprofundada, como análise da parede celular e reassociação DNA-DNA para tal afirmação.

O gênero *Streptomyces* é um actinomiceto aeróbio amplamente distribuído na natureza e são frequentemente isolados do solo e têm grande importância industrial, devido aos produtos que sintetizam. Eles são Gram-positivos, filamentosos e ramificados, normalmente produzem micélio de fungos que se fragmentam na forma de pequenos bastonetes (Koneman et al, 2008; Funke & Bernard, 2011).

A identificação de espécies de *Streptomyces* continua sendo problemática, já que atualmente existem mais de 600 espécies válidas descritas no momento deste estudo (Euzéby, 2013). Foi evidente que a maior parte das nossas amostras de *Streptomyces* apresentou valor de similaridade maior do que 98,70% (Stackebrandt & Ebers, 2006) com diferentes espécies o que impediu a conclusão da identificação ao nível de espécies.

Com a intenção de concluir a identificação dessas amostras ao nível de espécie, nós usamos a Análise da Sequência Multilocus (MLSA) e esta metodologia só contribuiu para a identificação de uma amostra ao nível de espécie.

Os bastonetes Gram-positivos Irregulares e actinomicetos aeróbios incluem organismos que são reconhecidos agentes patogênicos humanos, bem como várias outras espécies que são principalmente encontradas no meio ambiente. Nos últimos anos, as bactérias consideradas de origem ambiental têm sido encontradas com maior frequência em associação com a infecção em seres humanos, e muitos novos táxons destes micro-organismos foram descritos (Drancourt et al, 2004, Gil-Sande et al, 2006).

Das 48 cepas, 22 (45,83%) foram identificadas ao nível da espécie. Em 2 das 48 (4,16%) cepas não foi possível atribuir o gênero por métodos moleculares. Estas cepas podem ser apenas discriminadas ao nível de família e provavelmente representam novo gênero. Uma limitação da análise da sequência do gene 16S rRNA é a sua incapacidade para discriminar um novo táxon bacteriano, tal como para essas duas cepas que não puderam ser identificados ao nível gênero por este método.

Outra limitação ocorre quando os micro-organismos dividem identidades quase completas da sequência do gene 16S rRNA e, conseqüentemente, não podem ser seguramente separadas no nível de espécie. Muitas de nossas amostras não puderam ser identificadas ao nível da espécie, devido a relação muito próxima entre si e por terem apresentadas similaridades maiores que 98,7% com a análise das sequências do gene 16S rRNA com diferentes espécies.

A dificuldade de usar outros genes conservados reside no fato de que ainda não estão disponíveis sequências depositadas nos bancos de dados da maioria das espécies que foram mais similares com nossas amostras indicados pela análise da sequência do gene 16S rRNA.

O gênero mais descrito em nosso estudo foi o *Microbacterium*. Apesar do fato de algumas espécies de *Microbacterium* ter demonstrado importância clínica, as infecções provocadas por este gênero têm aumentado recentemente em número (Lau et al, 2002, Laffineur et al, 2003, Giammanco et al, 2006, Ko et al, 2007).

A análise da sequência do gene 16S rRNA foi um meio eficaz para a identificação de bastonetes Gram positivos irregulares e actinomicetos aeróbios não identificáveis por métodos fenotípicos, uma vez que foi capaz de resolver 95,83% de identificações ao nível gênero e 35,42% para o nível de espécie. A análise dos genes *recA* e *rpoB* para as amostras identificadas como *Microbacterium* contribui para identificar mais três amostras desse gênero ao nível de espécie. A análise da Sequência Multilocus (MLSA) para as amostras identificadas como *Streptomyces* somente contribui para a identificação de uma amostra ao nível de espécie.

Através da análise filogenética, pudemos comprovar através da estabilidade das topologias e do alto poder discriminatório de cada árvore analisadas, para as cepas distribuídas nas tabelas 1, 2 e 3 (manuscrito 3) e seus respectivos genes, vemos grupamentos formados com altos valores de “bootstrap” que corroboram com nossos resultados obtidos (Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 encontrados no trabalho 3).

A metodologia molecular também fornece uma oportunidade para descrever novas espécies de bactérias encontradas no meio ambiente de salas limpas. Moissl e colaboradores (2007) sugerem a pesquisa sobre os micro-organismos não Bacilares e seu potencial impacto sobre as operações em salas limpas. Todos os micro-organismos implicados em falhas no teste de esterilidade, incluindo aqueles no ambiente em que o teste de esterilidade é realizado, devem ser identificados (USP Pharmacopeia, 2013).

É geralmente aceito que a identificação dos isolados microbianos é útil na investigação da contaminação microbiana, e o nosso objetivo é o de determinar se os materiais de ensaio foram inadvertidamente contaminados durante a amostragem ou durante a execução do teste, ou se é o produto que está contaminado.

Este estudo produziu conhecimento sobre a microbiota em ambientes de sala limpa e também pode ajudar na investigação da origem da contaminação de outros ambientes (industrial ou médico), bem como áreas de fabricação de produtos farmacêuticos.

Nós realizamos análises filogenéticas, fenotípicas e genotípicas para determinar a posição taxonômica de três cepas não identificadas como contaminantes de ambiente de sala limpa. Este estudo permitiu-nos encontrar um novo gênero pertencente à família *Propionibacteriaceae* e espécie pertencente à família *Nocardioideaceae*.

A classe Actinobacteria constitui um dos principais filos das bactérias (Ludwig & Klenk, 2001). Muitos estudos descrevem a dificuldade de identificar vários grupamentos bacterianos, tais como as bactérias pertencentes a esta classe, como os bastonetes Gram positivos aeróbios por métodos fenotípicos (Drancourt et al, 2004;. Roux et al, 2004,. Patel et al, 2004).

Sequências quase completas do gene 16S rRNA foram obtidas para todas as cepas, os quais não puderam ser atribuídos um gênero através de procedimentos convencionais de identificação, e as suas sequências estão disponibilizados para efeitos de comparação (Tabela 1 do trabalho 4).

Duas cepas não puderam ser identificadas ao nível gênero e o outro isolado não pode ser identificado ao nível de espécie por este método. O isolado 3117BRRJ mostrou apenas similaridade de 97,03% da sua sequência com a espécie *Nocardioides alkalitolerans* (cepa tipo), e este isolado foi relatado como *Nocardioides* sp. Foi encontrada topologia semelhante nas árvores geradas com o algoritmo maximum likelihood. A análise filogenética sugere que o nosso isolado 3117BRRJ está associado ao gênero *Nocardioides* spp. e consideramos adequado descrever este organismo como uma espécie nova de *Nocardioides*.

As cepas 3712BRRJ e 3371BRRJ mostraram 92,80 a 94,37% de similaridade com a sequência do gene 16S rRNA com várias espécies de famílias pertencentes à subordem *Propionibacterineae*. As sequências de 16S rRNA dessas duas amostras foram idênticas, mas estas cepas foram coletadas em diferentes anos. Como mostrado na árvore filogenética baseada no método “neighbor joining”, as cepas 3712BRRJ 3371BRRJ formaram uma distinta linhagem evolutiva dentro do grupo formado compreendendo um gênero diferente. Os níveis de similaridade das sequências do gene 16S rRNA foram mais similares a diferentes gêneros, variando entre 91,59% e 94,39% para o *Luteococcus japonicus* ao *Microclunatus phosphovorius* respectivamente (Tabela 1 do trabalho 4). Vale ressaltar que os gêneros mais similares às nossas cepas 3712BRRJ e 3371BRRJ foram relativamente descritos nos últimos anos (Euzéby, 2013).

Foi sugerido que as experiências de hibridação DNA-DNA seja realizado apenas para cepas que compartilham um valor de similaridade inferior a 98,7%, com a análise da sequência do gene 16S rRNA a fim de reduzir a carga de trabalho envolvida com este tipo de experiência (Stackebrandt & Ebers, 2006). Como os nossos valores de similaridade da sequência do gene 16S rRNA para todas as cepas estudadas foi inferior a 96,8%, com os resultados mais similares com bactérias conhecidas encontradas nos bancos de dados consultadas, não realizamos experiências de reassociação DNA-DNA.

Com base nos dados morfológicos, genotípicos e bioquímicos apresentados neste estudo, o isolado 3117BRRJ deve ser classificado como uma nova espécie, para o qual o nome *Nocardioides brasiliensis* é proposto, e as outras duas cepas 3712BRRJ e 3371BRRJ devem ser classificadas em um novo gênero para o qual o nome *Guaraldella brasiliensis* é proposto.

5 CONCLUSÕES

- A identificação do *C. striatum* confirmada pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB* permitiu detectar um surto nosocomial no Rio de Janeiro;
- A análise por PFGE indicou a presença de quatro perfis moleculares, incluindo dois clones de *C. striatum* MDR (perfil PFGE I e II). O perfil PFGE I foi predominante e observado principalmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva e enfermarias cirúrgicas;
- A especiação de *Nocardia* por MLSA alterou a identificação bioquímica inicial da maior parte das estirpes brasileiras testadas;
- Análise PFGE das cepas de *N. nova* isoladas de um mesmo paciente revelou dois perfis distintos. Verificamos co-infecção por dois clones de *N. nova* em um paciente;
- Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro relato de identificação das espécies *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica* e *N. exalbida/N. gamkensis* no Brasil;
- Nocardiose pode ser mais comum no Brasil e em outros países tropicais em desenvolvimento do que é atualmente reconhecido e MLSA auxilia na identificação precisa do gênero *Nocardia*;
- Uma ampla diversidade de BGPIs e actinomicetos aeróbicos de vários gêneros foram detectados em sala limpa. Estes micro-organismos são um risco considerável de contaminação das áreas de produção de produtos farmacêuticos;
- A análise da sequência do gene 16S rRNA foi eficaz para a identificação dos BGPIs e actinomicetos aeróbicos de origem ambiental, uma vez que 95,83 % dos gêneros foram identificados;
- A análise da sequência do gene 16s rRNA concluiu a identificação ao nível de espécie de cinco cepas ambientais de *Microbacterium* enquanto que a análise dos genes *rpoB* e *recA* concluiu a identificação de mais três cepas;
- A análise da sequência do gene 16s rRNA concluiu a identificação ao nível de espécie de duas cepas de *Corynebacterium* e mais duas cepas foram identificadas ao nível de espécie pela análise da sequência do gene *rpoB*.
- A análise da sequência do gene 16s rRNA concluiu a identificação ao nível de espécie de duas cepas ambientais de *Streptomyces* e os fragmentos das sequências dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB* contribuíram para a identificação ao nível de espécie de uma única cepa;

- Um novo gênero e espécie da classe das Actinobacterias foram descritos. Com base nos dados morfológicos, genotípicos e bioquímicos apresentados neste estudo a cepa de origem ambiental 3117BRRJ representa uma nova espécie do gênero *Nocardioides*, para o qual o nome *Nocardioides brasiliensis* sp. nov. foi proposto. As cepas ambientais 3712BRRJ e 3371BRRJ devem ser classificadas em um novo gênero para o qual o nome *Guaraldella brasiliensis* foi também proposto.

REFERÊNCIAS

- Abreu, C. S; Pinto, T. J. A. E; Oliveira, D. C. Incidência de microrganismos em salas limpas. *Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*. 2003; 13:14-17.
- Adames H, Baldoví S, Martin-Cleary C, Ortiz A, Esteban J. Peritonitis due to *Microbacterium* sp in a patient on cyclor peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis International* 2010; 30:669-70.
- Adderson E.E, Boudreaux J.W, Hayden r. T. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. *The Pediatric Infection Disease Journal* 2008; 27:136-141.
- Agterof M.J, van der Bruggen T, Tersmette M, ter Borg E.J, van den Bosch J.M, Biesma D.H. Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. *The Netherlands Journal of Medicine* 2007; 199-202.
- Alnaum H.M, Elhassan M.M, Mustafa F.Y, Hamid M.E. Prevalence of *Nocardia* species among HIV-positive patients with suspected tuberculosis. *Tropical Doctor*. 2011; 41: 224-226.
- Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection* 2010; 38: 89-97.
- Amor A, Enríquez A, Corcuera MT, Toro C, Herrero D, Baquero M. Is Infection by *Dermatophilus congolensis* Underdiagnosed? *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49:449–451.
- Baily G.G, Neill P, Robertson V.J. Nocardiosis: a neglected chronic lung disease in Africa? *Thorax* 1988; 43: 905-910.
- Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TC, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2013; 108:23-29.
- Baio, P. V. P. Identificação Bioquímica e Caracterização Molecular de Bactérias Corineformes e Nocardiformes de origem ambiental. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2007.
- Batista M.V, Pierrotti L.C, Abdala E, Clemente W.T, Girão E.S, Rosa D.R, Ianhez L.E, Bonazzi P.R, Lima A.S, Fernandes P.F, Pádua-Neto M.V, Bacchella T, Oliveira AP,

Viana C.F, Ferreira M.S, Shikanai-Yasuda M.A. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Tropical Medicine & International Health* 2011; 16: 1134-1142.

Bernard, K. The Genus *Corynebacterium* and other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50:3152-3158.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8 Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA. New York: Springer, 1974.

Biomerieux Vitek. Manual de referência de microbiologia. 2003. 510759-1PT-A Ver. 08. BioMerieux, Inc, 2003.

Bonnet F,Donay JL,Fieux F,Marie O,de Kerviler E,Jacob L. Postoperative nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum*: pitfalls and delayed diagnosis *Annales Françaises d Anesthesie et de Reanimation* 2007; 26: 680-684.

Brown-Elliott BA, Biehle J, Conville PS, Cohen S, Saubolle M, Sussland D, Wengenack N, Kriel K, Bridge L, McNulty S, Vasireddy R, Wallace RJ Jr . Sulfonamide resistance in isolates of *Nocardia* spp. from a US multicenter survey. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50: 670-672.

Brown J.M, McNeil M.M. *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes, p. 370–398. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C, 2003.

Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 259-282.

Budzic JM, Hosseini M, Mackinnon AC Jr, Taxy JB. Disseminated *Nocardia farcinica*: literature review and fatal outcome in an immunocompetent patient. *Surgical Infections (Larchmt)* 2012; 13: 163-170.

Biomerieux Technical Bulletin Manual Industrial. 510722-4. Rev.1002. BioMerieux, Inc.2002. Disponível em: <<http://www.biomerieux.com>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

Biomerieux. APIWEB - Disponível em: <<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, Böttger EC, Altwegg M. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 4134-4140.

Brandenburg A. H, Van Belkum A, Van Pelt C, Bruining H.A, Mouton J.W, Verbrugh H.A. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34: 2089-2094.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 49 de 23 de novembro de 2010. Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, constituída de Volume 1 - Métodos Gerais e textos e Volume 2 - Monografias. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, DF, 11 de novembro de 2010.

Campanile F, Carretto E, Barbarini D, Grigis A, Falcone M, Goglio A, Venditti M, Stefani S. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerging Infection Disease* 2009; 15: 75-78.

Cattaneo C, Antoniazzi F, Caira M, Castagnola C, Delia M, Tumbarello M, Rossi G, Pagano L. *Nocardia* spp infections among hematological patients: results of a retrospective multicenter study. *International Journal of Infectious Diseases* 2013; 27.

Cho EJ, Sung H, Park SJ, Kim MN, Lee SO. *Rothia mucilaginosa* Pneumonia Diagnosed by Quantitative Cultures and Intracellular Organisms of Bronchoalveolar Lavage in a Lymphoma Patient. *Annals of Laboratory Medicine* 2013; 33:145-9.

Castro LG, Piquero-Casals J. Clinical and mycologic findings and therapeutic outcome of 27 mycetoma patients from São Paulo, Brazil. *International Journal of Dermatology* 2008; 47: 160-163.

Castro LG, Belda Júnior W, Salebian A, Cucé LC. Mycetoma: a retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989. *Mycoses* 1993; 36: 89-95.

Chedid MB, Chedid MF, Porto NS, Severo CB, Severo LC. Nocardial infections: report of 22 cases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2007; 49: 239-246.

Clark NM, AST Infectious Diseases Community of Practice. *Nocardia* in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 2009; 9 (Suppl 4): S70– S77.

Clarridge III, J. E. Impact of 16S r RNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17: 840-862.

Conville PS, Witebsky F. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and Other Aerobic Actinomycetes. In: Versalovic, J., Carroll, K. C, 2011; 440-468.

Conville P.S, Witebsky F.G. Organisms designated as *Nocardia asteroides* drug pattern type VI are members of the species *Nocardia cyriacigeorgica*. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 2257-2259.

Conville PS, Witebsky FG. Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 2881-2885.

Conville P. S., Zelazny A. M. & Witebsky F. G. Analysis of *secA1* Gene Sequences for Identification of *Nocardia* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 2760–2766.

Condas L.A.Z, Ribeiro M.G, Gono T, Matsuzawa T, Yazawa K, Motta R.G, Franco M.M.J, Listoni F.J.P. Molecular identification and thermoresistance to boiling of *Nocardia Farcinica* and *Nocardia Cyriacigeorgica* from bovine bulk tank milk. *Brazilian Journal of Microbiology* 2012; 43: 1038-1041.

Cordeiro F, Bruno C, Reis C. Mycetoma. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 85: 791.

Colwell R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology* 1970; 104:410-433.

Coyle, M & B; Lipsky, B. A. Coryneform Bacteria in Infectious Diseases: clinical and laboratory aspects. *Clinical Microbiology Reviews* 1990; 3:227-46.

Cundell, A. M. Microbial Identification Strategies in the Pharmaceutical Industry. *Technology Application* 2006; 60:111-123.

Datta P, Arora S, Jain R, Chander J, van de Sande W. Secondary peritonitis caused by *Streptomyces viridis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50:1813-4.

Drancourt, M; Berger, P; Raoult, D. Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:2197-2202.

Drancourt & Raoult. Sequence-Based Identification of New Bacteria: a Proposition for Creation of an Orphan Bacterium Repository. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43:4311– 4315.

Dresch TFLR, Magalhães TC, Piñeiro-Maceira J, Akiti T, Ramos-e-Silva M. Combined Therapy for Mycetoma: Medical and Surgical Dermatologic. *Surgery* 2010; 36: 952–954.

Eigner U, Schmid A, Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Analysis of the Comparative Workflow and Performance Characteristics of the VITEK 2 and Phoenix Systems. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43:3829-3834.

Enoch DA, Richardson MP, Hill RL, Scorer PM, Sismey A. Central venous catheter-related bacteraemia due to *Microbacterium paraoxydans* in a patient with no significant immunodeficiency. *Journal of Clinical Pathology*; 2011; 64:179-80.

Euzéby, J. P., List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/>> Acesso em: 19 de março de 2013.

Francis MJ, Doherty RR, Patel M, Hamblin JF, Ojaimi S, Korman TM. *Curtobacterium flaccumfaciens* septic arthritis following puncture with a Coxspur Hawthorn thorn. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49:2759-60.

Farmacopéia Brasileira. Métodos Biológicos 5^a. ed. São Paulo: Atheneu, 2010; part. 1; 1:207.

Funke, G; Bernard, K. A. Coryneform Gram-Positive Rods. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington. D. C: ASM Press; 2011. 413-442.

Funke G, Renaud FN, Freney J, Riegel P. Multicenter Evaluation of the Updated and Extend API (RAPID) CORYNE Database 2.0. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35:3122-3126.

Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th. Ed. ASM Press, Washington. D. C, 2011.

Gardenier JC, Sawyer RG, Sifri CD, Brayman K, Wispelway B, Bonatti H. Peritonitis caused by *Haemophilus parainfluenzae*, *Leifsonia aquatica*, and *Gordonia* spp. in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Surgical Infections* 2012; 13:409-12.

Gevers D, Dawyndt P, Vandamme P, Willems A, Vancanneyt M, Swings J, De Vos P. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2006; 29:1911–1916.

Gevers D, Cohan F.M, Lawrence J.G, Spratt B.G, Coenye T, Feil E.J, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson F.L, Swings J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3: 733-739.

Giammanco G M, Pignato S, Grimont P A D, Grimont F, Santangelo C, Leonardi G, Giuffrida A, Legname V & Giammanco G. Interstitial pulmonary inflammation due to *Micobacterium* sp. after heart transplantation. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55: 335-339.

Gil-Sande, E. et al. Etiological Misidentification by Routine Biochemical Tests of Bacteremia Caused by *Gordonia terrae* Infection in the Course of an Episode of Acute Cholecystitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44:2645–2647.

Godet C., Beraud G., Cadranel J. Bacterial pneumonia in HIV-infected patients (excluding mycobacterial infection). *Revue Maladies Respiratoires* 2012; 29:1058-66.

Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; 57:81-9.

Grove D. I; Der-Haroutian, V; Ratcliff, R. M. *Aureobacterium* masquerading as '*Corynebacterium aquaticum*' infection: case report and review of the literature. *Journal of Medical Microbiology* 1999; 48:965-70.

Guo Y., Zheng W., Rong X. & Huang Y. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; 58:149–159.

Gürtler V., Mayall B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51:3-16.

Hanage W. P.; Fraser C.; Spratt B. G. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2006; 29:1917–1927.

Hofling-Lima A.L, Branco B.C, Romano A.C, Campos M.Q, Moreira H, Miranda D, Kwitko S, de Freitas D, Casanova FH, Sartori M, Schor P, Souza LB. Corneal infections after implantation of intracorneal ring segments. *Cornea* 2004; 23: 547-9.

Hong S.B, Han K, Son B.R, Shin K.S, Rim B.C. First case of *Nocardia nova* spinal abscess in an immunocompetent patient. The Braziliam Journal of Infection Diseases 2012; 16:196-199.

Iso 14644-1, International Standarization Organization. Cleanrooms and associated controlled environments. 1999. Disponível em: <http://acquisition.jpl.nasa.gov/rfp/JSL-52404/ISO14644-11999.pdf> >. Acesso em: 10 mar. 2013.

Jacomelli M, Silva PR, Rodrigues AJ, Demarzo SE, Seicento M, Figueiredo VR. Bronchoscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with negative sputum smear microscopy results. Jornal Brasileiro de Pneumologia 2012; 38: 167-173.

Jeon Y, Kim TS, Kim HB, Park KU, Song J, Kim EC. First Korean case of *Robinsoniella peoriensis* bacteremia in a patient with aspiration pneumonia. Annals of Laboratory Medicine 2012; 32:370-4.

Jorna T, Taylor J. Disseminated *Nocardia* infection in a renal transplant patient: the pitfalls of diagnosis and management. BMJ Case Reports 2013; 15.

Kanne J.P, Yandow DR, Mohammed T.L, Meyer C.A. C.T findings of pulmonary nocardiosis AJR American Journal of Roentgenology 2011; 197: W266-W272.

Karunakaran R. et al. *Tsukamurella tyrosinosolvans* intravascular catheter-related bacteremia in a haematology patient: a case report. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2011; 15:1343-6.

Khamis A, Raoult D, LA Scola B. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42:3925-3931.

Kiska D.L, Hicks K, Pettit D.J. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40: 1346-1351.

Kirby R, Sangal V, Tucker NP, Zakrzewska-Czerwinska J, Wierzbicka K, Herron PR, Chu CJ, Chandra G, Fahal AH, Goodfellow M, Hoskisson PA. Draft genome sequence of the human pathogen *Streptomyces somaliensis*, a significant cause of actinomycetoma. Journal of Bacteriology 2012; 194:3544-5.

Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, Chen X, Chen S.C. secA1 gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity. Journal of Clinical Microbiology 2010; 48: 3928-3934.

Ko K S, Oh W S, Lee M Y, Peck K R, Lee N Y & Song J-H. A new *Microbacterium* species isolated from the blood of a patient with fever: *Microbacterium pyrexiae* sp. nov. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 57: 393–397.

Koneman E. W; Allen S. D; Janda W. M; Washington, C. W. *Diagnóstico Microbiológico*. Guanabara Koogan, 6a. edição. Rio de Janeiro. 2008.

Konstantinidis K. T.; Ramette A.; Tiedje J. M. The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*; 2006; 361:1929-1940.

La Duc M T, Dekas A, Osman S, Moissl C, Newcombe D & Venkateswaran K. Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating the Extreme Conditions of Clean Room Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73: 2600–2611.

Lago R F, Costa N.R. Policy dilemmas in providing antiretroviral treatment in Brazil. *Ciência Saúde Coletiva* 2010; 15: 3529-3540.

Lai CC, Wang CY, Liu CY, Tan CK, Lin SH, Liao CH, Chou CH, Huang YT, Lin HI, Hsueh PR. Infections caused by *Gordonia* species at a medical centre in Taiwan, 1997 to 2008. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; 16:1448-53.

Lai P. C., Chen Y. S., Lee S. S. Infective endocarditis and osteomyelitis caused by *Cellulomonas*: a case report and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009; 65:184-7.

Laffineur K, Avesani V, Cornu G, Charlier J, Janssens M, Wauters G & Delmée M. Bacteremia Due to a Novel *Microbacterium* Species in a Patient with Leukemia and Description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 2242–2246.

Lau SK, Woo PC, Woo GK, Yuen KY. Catheter- related *Microbacterium* bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing. *Journal Clinical. Microbiology* 2002; 40:2681-2685.

Lin C.C, Lalitha P, Srinivasan M, Prajna N.V, McLeod SD, Acharya N.R, Lietman T.M, Porco T.C. Seasonal trends of microbial keratitis in South India. *Cornea* 2012; 31:1123-1127.

Liu W.L, Lai C.C, Ko W.C, Chen Y.H, Tang H.J, Huang Y.L, Huang Y.T, Hsueh P.R. Clinical and microbiological characteristics of infections caused by various *Nocardia* species in Taiwan: a multicenter study from 1998 to 2010. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2011; 30: 1341-1347.

Londero A.T, Ramos C.D, Matte S.W. Actinomycotic mycetomas in Rio Grande do Sul - report of 4 cases Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1986; 81: 73-7.

Lemaitre F, Stein A, Raoult D, Drancourt M. Pseudoclavibacter-like subcutaneous infection: a case report. Journal of Medical Case Reports 2011; 20:468.

Leonard R.B, Nowowiejski D.J, Warren J.J, Finn D.J, Coyle M.B. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. Journal of Clinical Microbiology 1994; 32: 164-169.

Lopes J.O, Bassanesi M.C, Alves S.H, Salla A, Benevenga J.P, Castro M.S. Cutaneous *Nocardia asteroides* infection of nontraumatic origin. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 1994; 36: 403-408.

Lopes J.O, Silva C.B, Kmohan C, Oliveira L.T, Dal Forno N.L, Pereira C.C. Acute primary cutaneous *Nocardia asteroides* infection in a patient with systemic lupus erythematosus. Case report. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 1995; 37: 547-50.

Magro-Checa C, Chaves-Chaparro L, Parra-Ruiz J, Peña-Monje A, Rosales-Alexander JL, Salvatierra J, Raya E. . Septic arthritis due to *Cellulosimicrobium cellulans*. Journal of Clinical Microbiology 2011; 49:4391-3.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 1998; 95:3140-5.

McTaggart L.R, Richardson S.E, Witkowska M,Zhang S.X. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. Journal of Clinical Microbiology 2010; 48: 4525-4533.

Magalhães V. D; Ferreira J. C; Barelli C; Darini1 A. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia uma revisão técnica. Revista do Instituto Adolfo Lutz 2005; 64:155-161.

Martin J, Bemer P, Touchais S, Asseray N, Corvec S. Recurrent abscesses due to *Finnegoldia magna*, *Dermabacter hominis* and *Staphylococcus aureus* in an immunocompetent patient. Anaerobe 2009;15:201-3.

Martinez-Martinez L, Suárez AI, Winstanley J, Ortega MC, Bernard K. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33:2458-2461.

Martinez-Martinez L, Pascual A, Bernard K, Suárez AL. Antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium striatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40: 2671-2672.

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

Mattos-Guaraldi AL, Damasco PV, Gomes DL, Melendez MG, Santos LS, Marinelli RS, Napoleão F, Sabbadini PS, Santos CS, Moreira LO, Hirata R Jr. Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. *Journal of Medical Microbiology* 2011; 60:1685-8.

Mascarenhas J, Srinivasan M, Chen M, Rajaraman R, Ravindran M, Lalitha P, Oldenburg CE, Ray KJ, Glidden DV, Costanza S, Lietman TM, Acharya NR. Differentiation of etiologic agents of bacterial keratitis from presentation characteristics. *Int Ophthalmol* 2012; 32: 531-538.

Mignard, S & Flandrois, J. P. 16S rRNA Sequencing in Routine Bacterial Identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* 2006; 67:574–581.

Minero M.V, Marín M, Cercenado E, Rabadán P.M, Bouza E, Muñoz P. Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine (Baltimore)* 2009; 88: 250-261.

Motta R.L, Vilela R.V, Lambertucci J.R. Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004; 37: 287-288.

Mistry NF, Dholakia Y, D'Souza DT, Taylor M, Hoffner S, Birdi TJ. *Rhodococcus* and *Mycobacterium Tuberculosis*: masquerade or mixed infection. *The International Journal of Tuberculosis Lung Disease* 2006; 10:351-3.

Mohamed el SW, Mohamed el NA, Yousif Bel D, Fahal AH. Tongue actinomycetoma due to *Actinomyces madurae*: a rare clinical presentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012; 70:622-4.

Nahrstedt H.; Schroder C.; Meinhardt F. Evidence for two recA genes mediating DNA repair in *Bacillus megaterium*. *Microbiology* 2005; 151:775–787.

Nascimento EG, Carvalho MJ, de Freitas D, Campos M . Nocardial keratitis following myopic keratomileusis. *Journal of Refractive Surgery* 1995; 11: 210-211.

No authors listed. *Nocardia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole? Maybe not. *The Clinical Infection Disease* 2012; 55.

Nunn, A.S, Fonseca E.M, Bastos F.I, Gruskin S, Salomon J.A. Evolution of antiretroviral drug costs in Brazil. In the context of free and universal access to Aids treatment. www.Plosmedicine.Org/.../Journal.P.med.0040305, 2011.

Nwuba CO, Kogo G, Ogbu N, Abolarin O, Okonkwo R. Nocardiosis - an emerging complication in the clinical management of HIV infected patients. *Retrovirology* 9 (Suppl 1):P134. <http://www.retrovirology.com/content/9/S1/P134>, 2012.

Ohtaki H, Ohkusu K, Sawamura H, Ohta H, Inoue R, Iwasa J, Ito H, Murakami N, Ezaki T, Moriwaki H, Seishima M. First report of acute cholecystitis with sepsis caused by *Cellulomonas denverensis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47:3391-3.

Oren A. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *The Royal Society* 2004; 359:623-638.

Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Ezaki T, Kimura S.. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* 2006; 54: 109-114.

Park JS, Hong KH, Lee HJ, Choi SH, Song SH, Song KH, Kim HB, Park KU, Song J, Kim EC. Evaluation of three phenotypic identification systems for clinical isolates of *Raoultella ornithinolytica*. *Journal of Medical Microbiology* 2011; 60:492-9.

Patel J B, Wallace Jr R J, Brown-Elliott B A, Taylor T, Imperatrice C, Leonard D G B, Wilson R W, Mann L, Jost K C & Nachamkin I. Sequence-Based Identification of Aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 2530–2540.

Pellegrini GJ Jr, Graziano JC, Rangunathan L, Bhat MA, Hemashettar BM, Brown JM. Scalp abscess due to *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, first report in a human infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50:1484-6.

Perkin S, Wilson A, Walker D, McWilliams E. *Dietzia* species pacemaker pocket infection: an unusual organism in human infections. *BMJ Case Reports* 2012; 14.

Petti C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 15:1108-1114.

Pinto T. J. A. Teste de Esterilidade. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2^a. Edição. 2002.

Pelleg A.Y, Husain S, Qureshi Z.A, Silveira F.P, Sarumi M, Shutt K.A, Kwak E.J, Paterson D.L. Risk factors, clinical characteristics, and outcome of *Nocardia* infection in organ transplant recipients: a matched case-control study. *The Clinical Infection Disease* 2007;44: 1307-1314.

Piller, R.V.B. Epidemiologia da Tuberculose. *Pulmão* 121:4-9. www.sopterj.com.br/revista/2012_21_1/02.pdf, 2012.

Portocarrero B, Ballmer P, Hess T, Karrer U. Secondary hypogammaglobulinemia with recurrent opportunistic pulmonary infection. *Therapeutische Umschau* 2012; 69:687-91.

Prakash O, Verma M, Sharma P, Kumar M, Kumari K, Singh A, Kumari H, Jit S, Gupta SK, Khanna M, Lal R. Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. *Indian Journal Microbiology* 2007; 47:98–108.

Rajendhran J., Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research* 2010; 166:99-110.

Ramos-Esteban J.C, Servat J.J, Silva R.S, Ambrósio R Jr, Tauber S, Bia F. Necrotizing nocardial scleritis after combined penetrating keratoplasty and phacoemulsification with intraocular lens implantation: a case report and review of the literature. *Arq Bras Oftalmol* 2007; 70: 355-359.

Rasheed M.U, Belay G. Nocardiosis in HIV seropositive clinically suspected pulmonary tuberculosis patients. *Tropical Doctor* 2008; 38: 34-35.

Reinmuller B, Ljungqvist B. Modern Cleanroom Clothing Systems: People as a Contamination Source. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2003; 57:114-125.

Renom F, Garau M, Rubi M, Ramis F, Galmes A, Soriano J.B. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 2064-2067.

Roth A, Andrees S, Kroppenstedt R.M, Harmsen D, Mauch H. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 851-6, 2003.

Reddy BS, Chaudhury A, Kalawat U, Jayaprada R, Reddy G, Ramana BV. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian Journal of Medical Microbiology* 2012; 30:52-57.

Richert K, Brambilla E, Stackebrandt E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16SrRNA genes. *Systematic and Applied Microbiology* 2007; 30:102–108.

Rivas R, Velázquez E, Zurdo-Piñeiro JL, Mateos PF, Martínez Molina E. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *Journal Microbiology Methods* 2004; 56:413-426.

Riviere E, Neau D, Roux X, Lippa N, Roger-Schmeltz J, Mercie P, Longy-Boursier M. Pulmonary streptomyces infection in patient with sarcoidosis, France, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18:1907-9.

Rkiouak A, Zinebi A, Rabhi M, Reggad A, Akhouad Y, Ennibi K, Boudlal M, Chaari J. Pulmonary nocardiosis and sarcoidosis. *Revue de Pneumologie Clinique* 2013; 21.

Rocha, C. L. Análise das Identificações realizadas no Setor de Identificação Bacteriana do DM/INCQS/FIOCRUZ no período de 1997 a 2004. Monografia. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2006.

Rossello-Mora, R., Amann, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology* 2001; 25:39–67.

Rosselló-Mora R. Updating prokaryotic taxonomy. *Journal of Bacteriology* 2005; 187:6255-6257.

Roux V, Drancourt M, Stein A, Riegel P, Raoult D & La Scola B. *Corynebacterium* Species Isolated from Bone and Joint Infections Identified by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 2231–2233.

Santamaria Saber LT, Figueiredo JF, Santos SB, Levy CE, Reis MA, Ferraz AS. Nocardia infection in renal transplant recipient: diagnostic and therapeutic considerations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 1993; 35: 417-21.

Santos M, Gil-Brusola A, Morale P. Infection by Nocardia in solid organ transplantation: thirty years of experience. *Transplantation Proceedings* 2011; 43: 2141-2144.

Saraça G.D, Towersey L, Hay R.J, Londero A.T, Martins Ede C, Amora A.T, Reis K.M, Mendonça AM, Estrella R.R. Mycetoma by *Nocardia asteroides*: a 9 year follow-up. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 1993; 35: 199-204.

Savini V, Fazii P, Favaro M, Astolfi D, Polilli E, Pompilio A, Vannucci M, D'Amario C, Di Bonaventura G, Fontana C, D'Antonio D. Tuberculosis-like pneumonias by the aerobic actinomycetes *Rhodococcus*, *Tsukamurella* and *Gordonia*. *Microbes and Infection* 2012; 14: 401-410.

Sullivan D.C, Chapman S.W. Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis/nocardia. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2010; 7: 216-221.

Sacchi CT, Whitney AM, Mayer LW, Morey R, Steigerwalt A, Boras A, Weyant RS, Popovic T. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases* 2002 a; 8:1117-1123.

Sacchi CT, Whitney AM, Reeves MW, Mayer LW, Popovic T. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *Journal. Clinical. Microbiology*; 2002 b; 40:4520-4527.

Saraya T, Ohkuma K, Kikuchi K, Tamura M, Honda K, Yamada A, Araki K, Ishii H, Makino H, Takei H, Karita S, Fujiwara M, Takizawa H, Goto H. Cytomegalovirus Pneumonia in a Patient with Interstitial Pneumonia and *Nocardia asiatica* Presenting as Cavitory Lung Lesions. *Internal Medicine* 2013; 52:593-7.

Satomi M.; La Duc M. T.; Venkateswaran K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; 56:1735-1740.

Schleifer K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* 2009; 32:533-542.

Shachor-Meyouhas Y, Ravid S, Suhair H, Kassis I. Primary cutaneous *Nocardia brasiliensis* cellulitis in immunocompetent child. *Harefuah* 2012; 151:476-8.

Sharma P, Diene SM, Gimenez G, Robert C, Rolain JM. Genome sequence of *Microbacterium yannicii*, a bacterium isolated from a cystic fibrosis patient. *Journal of Bacteriology* 2012; 194:4785.

Sharma B, Ghosh G, Kamble U, Chaudhary K, Chauhan A, Lamba BM, Chowdhary A, Gupta BB. Allergic broncho pulmonary aspergillosis complicated by nocardiosis. *Case Reports in Pulmonology* 2012; 25.

Shigeta N, Ozaki K, Hori K, Ito K, Nakayama M, Nakahira K, Yanagihara I. An *Arthrobacter* spp. bacteremia leading to fetal death and maternal disseminated intravascular coagulation. *Fetal and Pediatric Pathology* 2013; 31:25-31.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology* 2002; 52:1043-1047.

Stackebrandt E. & Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 2006; 33:152-155.

Staley J. T. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 2006; 361:1899-1909.

Staley J. T. Universal species concept: pipe dream or a step toward unifying biology? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2009; 36:1331-1336.

Sutton S. V. W; Cundell A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. *Pharmacopeial Forum* 2004; 30:1884-1894.

Fe Talento A, Malnick H, Cotter M, Brady A, McGowan D, Smyth E, Fitzpatrick F. *Brevibacterium otitidis*: an elusive cause of neurosurgical infection. *Journal of Medical Microbiology* 2013; 62:486-8.

Tang YW, Von Graevenitz A, Waddington MG, Hopkins MK, Smith DH, Li H, Kolbert CP, Montgomery SO, Persing DH. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38:1676-8.

Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *Journal of Medical Microbiology* 2010; 59: 165-171.

Tan C.K, Lai C.C, Lin S.H, Liao C.H, Chou C.H, Hsu H.L, Huang Y.T, Hsueh P.R. Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998-2008. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; 16 966-72.

The United State Pharmacopeia 35.National Formulary 30. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2012.

Thompson CC, Thompson FL, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Dawyndt P, Swings J. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004; 54:919–924.

Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB, Swings J. Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71:5107– 5115.

Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010; 60:249-66.

Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pépin J. Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988-2008. *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17: 690-696.

Uhde K.B, Pathak S, McCullum I Jr, Jannat-Khah D.P, Shadomy S.V, Dykewicz C.A, Clark T.A, Smith T.L, Brown J.M. Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995-2004. *The Clinical Infection Disease* 2010; 51: 1445-1448.

United States Pharmacopeial Convention. Microbiological Evaluation of Clean Rooms and other Controlled Environments. In: United States Pharmacopeial Convention (ed), *The United States Pharmacopoeia*, vol. 31, Rockville, 2013; 582-589.

Urbano A.P, Urbano A.P, Torigoe A.M.S, Urbano I, Kara-José N. Spontaneous nocardial scleritis: case report. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2003; 66: 223-225.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 1996; 60:407-438.

Vos M. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. *Trends in Microbiology* 2011; 19:1-7.

Vuotto F, Faure K, Queyre V, Dessein R, Pasquet A, Lambert M, Haulon S, Beregi J, Guery B, Hatron P. Vascular nosocomial *Nocardia farcinica* infection after arterial stenting in an immunocompetent patient. *The Canadian Journal of Infection Diseases & Medical Microbiology* 2011; 22: e10-11.

Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M, Delmeé M. Distribution of nocardia species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 2624-8.

Wayne I. G; Brenner d. J, Colwell R. R, Grimont P. A. D, Kandler, Krichevsky M. I, Moore I. H, Moore W. E. C, Murray R. G. E, Stackebrandt E, Starr m. P, Truper H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1987; 37:463-464.

Weiss K, Labbé AC, Laverdière M. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *The Clinical Infection Disease* 1996; 23: 1246-1248.

Wilson J.W. *Nocardiosis*: updates and clinical overview. *Mayo Clinic Proceedings* 2012; 87: 403-7.

Whyte W. *Cleanroom Technology Fundamentals of Design, Testing and Operation*. Published by John Wiley & Sons Ltda, England, 2001.

Woese C. R. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* 1987; 51:221-271.

Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, A. L. Evolution Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87:4576-4579.

Woo PC, Ng KH, Lau SK, Yip KT, Fung AM, Leung KW, Tam DM, Que TL, Yuen KY. Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 59:1996–2001.

Wright SN, Gerry JS, Busowski MT, Klochko AY, McNulty SG, Brown SA, Sieger BE, Ken Michaels P, Wallace MR. *Gordonia bronchialis* sternal wound infection in 3 patients following open heart surgery: intraoperative transmission from a healthcare worker. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2012; 33:1238-41.

Wong K.Y, Chan Y.C, Wong C.Y. *Corynebacterium striatum* as an emerging pathogen. *The Journal of Hospital Infection* 2010; 76: 371-372.

Yasuma A, Ochiai T, Azuma M, Nishiyama H, Kikuchi K, Kondo M, Handa H. Exogenous coproporphyrin III production by *Corynebacterium aurimucosum* and *Microbacterium oxydans* in erythrasma lesions. *Journal of Medical Microbiology* 2011; 60:1038-42.

Yu X, Han F, Wu J, He Q, Peng W, Wang Y, Huang H, Li H, Wang R, Chen J. *Nocardia* infection in kidney transplant recipients: case report and analysis of 66 published cases. *Transplant Infectious Disease* 2011; 13: 385-391.

Zeigler DR. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; 53:1893–1900.

APÊNDICE A – Trabalho publicado na Journal of Clinical Microbiology (2011)

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, June 2011, p. 2283–2285
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.00326-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 6

Acinetobacter soli as a Cause of Bloodstream Infection in a Neonatal Intensive Care Unit[∇]

Flávia Lúcia Piffano Costa Pellegrino,^{1,2} Verônica V. Vieira,³ Paulo Victor Pereira Baio,³
Rosana Maria R. dos Santos,⁴ Ana Lucia Alves dos Santos,⁴ Nadir Gomes de Barros Santos,⁴
Martha Maria Gaudie Ley Meohas,⁴ Rodrigo Teixeira Santos,¹ Talita Coelho de Souza,²
Rubens Clayton da Silva Dias,⁵ Guilherme Santoro-Lopes,¹
Lee W. Riley,⁶ and Beatriz Meurer Moreira^{1,2*}

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho¹ and Instituto de Microbiologia of Universidade Federal do Rio de Janeiro,²
Fundação Oswaldo Cruz,³ Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro,⁴ Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro,⁵ Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and School of Public Health, University of California, Berkeley, California⁶

Received 15 February 2011/Returned for modification 20 March 2011/Accepted 7 April 2011

***Acinetobacter soli* is a new bacterial species described from forest soil. Five cases of bloodstream infection caused by *A. soli* clonal isolates are reported here for the first time. The patients were neonates admitted to an intensive care unit. This is a new neonatal pathogen with the potential to cause outbreaks.**

Bloodstream infections (BSIs) remain one of the most important complications in neonates admitted to hospitals (15). Although *Acinetobacter* sp. is a frequent pathogen in health care-associated infections, to date, only a few outbreaks of BSI caused by this agent in neonatal intensive care units (NICUs) have been described. Typically, these outbreaks are due to cross-transmission of strains, and a strong effort with combined interventions is essential to their control (9). *Acinetobacter baumannii* is the most pathogenic species of this genus (3); however, outbreaks caused by other species, such as *Acinetobacter junii* (2) and *Acinetobacter ursingii* (8), have been occasionally reported. In the present study, *Acinetobacter soli*, a species previously isolated only from forest soil (6), is described as the cause of an outbreak of BSI in neonates.

From 31 March to 8 April 2005, five neonates admitted to a 10-bed intensive care ward presented with symptoms of sepsis and isolation of a Gram-negative nonfermentative oxidase-negative rod from blood samples. The five isolates collected, one from each neonate, had identical colony morphology and biochemical reactions, but results were inconclusive. The infected neonates had been admitted to the unit on the days of their birth. The unit was a regular hospital ward adapted for intensive care, because the original neonatal intensive care unit in the hospital was closed a year before due to structural problems. On 8 April, after the fifth infant developed BSI with the unidentified rod, an outbreak became evident, and the neonates were transferred to another hospital; the ward was then closed. One neonate, who was severely compromised, progressed to death. The other four children were cured. All had negative blood cultures after 7 to 10 days of treatment. The clinical characteristics of patients with infection by the outbreak strain are shown in Table 1.

Biochemical properties of the study isolates were determined with API 20NE (bioMérieux, Hazelwood, MO) and conventional tests. Antimicrobial susceptibility to amikacin, ampicillin-sulbactam, cefepime, ceftazidime, gentamicin, imipenem, meropenem, piperacillin-tazobactam, sulfamethoxazole-trimethoprim, and tobramycin was tested by disk diffusion (1). The colistin MIC was determined by broth microdilution (1).

DNA fingerprints were determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with SpeI (Promega, Madison, WI) (10) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR (4). The species identification was performed by 16S rRNA (13), the *rpoB* gene, and flanking spacers (7) and *gyrB* gene (14) sequence analysis. To obtain the *gyrB* gene complete coding sequence, primers Rubgyr-sF (5'-CGC GTC GTT TAA GAG AGT T-3') and Rubgyr-sR (5'-CGC AAT ATC CAA CGC ACT T-3') were designed for PCR amplification and sequencing, with the following conditions: initial denaturation at 95°C for 2 min, 33 cycles at 95°C for 1 min, 51°C for 1 min, and 72°C for 2 min, and final extension at 72°C for 5 min. The sequences obtained in our study were compared to those of the single fully characterized, first described *A. soli* strain B1^T (6) and four other sequences of unpublished isolates deposited in GenBank, one *rpoB* sequence (GenBank accession number HM570037) and three 16S rRNA gene sequences (GenBank accession numbers FJ976560, FJ976568, and GQ258635).

All five study isolates shared very similar phenotypic characteristics. Cells grew well on Trypticase soy agar (TSA) and MacConkey agar media. On TSA, bacterial colonies were circular, convex, and smooth, had margins, and were approximately 2 mm in diameter after 24 h of incubation at 30°C. The isolates were Gram-negative rods, catalase positive, oxidase negative, nonmotile, and nonhemolytic on sheep blood agar. Biochemical test reactions were all negative, except for urease production. On API 20NE, the isolates had positive reactions for D-glucose assimilation, potassium gluconate, capric acid, adipic acid, malic acid, trisodium citrate, urease activity, and esculin hydrolysis. This biochemical profile gave an inconclu-

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. Phone: 55-21-25608344-R.131. Fax: 55-21-25608344. E-mail: bmeurer@micro.ufrj.br.

[∇] Published ahead of print on 27 April 2011.

TABLE 1. Clinical characteristics of patients with the outbreak strain

Characteristic	Information for patient:				
	1	2	3	4	5
Sex	Female	Female	Male	Female	Male
Gestational age (wk)	35	39	34	37	38
Mother's health	HIV positive	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy
Childbirth	Cesarean section	Vaginal	Cesarean section	Cesarean section	Vaginal
Birth wt (g)	1,350	3,560	2,285	2,670	2,655
Twin pregnancy	Yes	No	No	No	No
Baseline condition	First twin stillborn, hypoxic	Hypoxia	Congenital metabolic disease	Hypoxia	Meconium aspiration syndrome
Respiratory distress	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Date of isolation of BGN ^a	31 March 2005	2 April 2005	5 April 2005	6 April 2005	8 April 2005
Days from admission to BGN isolation	6	3	5	4	17
Medical procedure(s) before BGN isolation	Peripheral vein	Oxygen hood, peripheral vein	Intermittent mechanical ventilation, peripheral vein	Intermittent mechanical ventilation, peripheral vein	Central venous catheter, total parenteral nutrition
Antibiotic therapy before BGN isolation (no. of days)/reson	Ampicillin plus gentamicin (6)/clinical sepsis of maternal origin	None	Ampicillin plus gentamicin (2)/clinical sepsis of hospital origin	Ampicillin plus gentamicin (4)/clinical sepsis of maternal origin	Ampicillin plus gentamicin (10)/clinical sepsis of maternal origin; ceftazidime (7)/pneumonia
Antibiotic therapy to treat BGN (no. of days)	Ceftazidime (7)	Ampicillin plus gentamicin (14)	Ceftazidime (1)	Ceftazidime (2) followed by meropenem (12) and ciprofloxacin (10)	Ceftazidime, vancomycin, clarithromycin, and ciprofloxacin (7)
Outcome	Discharge	Discharge	Death	Discharge	Discharge

^a BGN, Gram-negative bacillus in the present study.

sive identification. Isolates were susceptible to all antimicrobial agents tested, including colistin (MIC, 0.25 µg/ml). All had indistinguishable PFGE and RAPD-PCR fingerprint patterns. PFGE fingerprints had 15 bands of about 194 kb to less than 48.5 kb.

All isolates shared identical 1,108-bp 16S rRNA gene sequences and were deposited in GenBank. Those sequences had 99 to 100% similarity with those of strain B1^T (6) and the three other *A. soli* sequences in GenBank (accession numbers FJ976560, FJ976568, and GQ25863). This high level of similarity with *A. soli* strongly indicated the identification of the strain. However, since this species had not been previously isolated from a clinical specimen while this work was taking place, a genetic identification in more detail was undertaken.

The *gyrB* and the partial *rpoB* gene and spacer sequences of two of the five isolates (788BRRJ and 789BRRJ) were studied. All results for both isolates were identical, and only the sequences of strain 788BRRJ were deposited in GenBank. In the analysis by BLASTn, the highest similarities were with two *A. soli* isolates, as follows: 98% for *gyrB* of strain B1^T (GenBank accession number EU622818) and 99% for *rpoB* zone 1 of strain K50-54 (GenBank accession HM570037.1). Thus, the 16S rRNA gene, *gyrB*, and *rpoB* sequences were concordant and defined the strain identification as *A. soli*.

In the present report, we describe an outbreak of BSI caused by *A. soli*, a species described in 2008 from an environmental specimen (6). The outbreak occurred in neonates admitted to an intensive care unit, a population prone to developing health care-associated infections. On the other hand, four of the five neonates were receiving antibiotics to which the bacterial isolate was susceptible, which is consistent with the hypothesis that a contaminated IV solution was the source of the outbreak. In fact, the five neonates had infections with a single genotype defined by two well-established fingerprinting methods, indicating that a point source and cross-transmission of the strain occurred in the unit. Alternatively, the laboratory reagents could have been contaminated by *A. soli* (a pseudo-outbreak). However, this is unlikely because all neonates had sepsis symptoms when blood cultures were drawn. Unfortunately, the unit was closed before any investigation could be carried out. Overcrowding and understaffing, conditions that facilitate the dissemination of pathogens, are common in neonatal units in many parts of the world and have been documented in a previous outbreak study in another NICU in our municipal health system (11). Hygienic conditions in the unit, a place originally used as a regular ward, were suboptimal and contributed to the decision to close the unit. No other isolates with similar characteristics were obtained from infants in the hospital to which they were transferred.

In distinction from the prototype *A. soli* strain B1^T, which had resistance to amikacin and gentamicin, the *A. soli* isolates of this study were susceptible to all agents tested, including these two aminoglycosides. This full susceptibility profile may have contributed to the success of the antimicrobial therapy observed in almost all cases. In fact, the single infant who died had a congenital metabolic disease that was probably the major determinant of the outcome.

Because this was the first time *A. soli* was detected from a clinical specimen, three sequence signatures, those for 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoB*, were determined. The three methods

gave consistent results; however, sequencing of the 351-bp *rpoB* zone 1 fragment seemed most convenient, as it alone provided an adequate discriminatory power.

Recently, with the use of sequence-based methods to identify *Acinetobacter* isolates to the species level, it became clear that several non-*A. baumannii* species cause severe clinical infections (12). Nevertheless, the epidemiological features and clinical impact of non-*A. baumannii* infections are still poorly understood. Multidrug resistance, for example, has been an important issue in *A. baumannii* infections, leading to the extensive use of polymyxins as a last resort, even in neonates, as recently reviewed (5). However, as Turton and colleagues have observed (12), the prevalence of antimicrobial resistance may vary widely across non-*A. baumannii* species. In the present outbreak, isolates of *A. soli* were susceptible to several antimicrobial agents.

In conclusion, we show for the first time that *A. soli* may cause invasive disease and may spread among patients. Antimicrobial resistance does not seem to be a problem at the moment. Identification by sequencing a small *rpoB* fragment (zone 1) is feasible.

Nucleotide sequence accession numbers. All five isolates described here were deposited in GenBank under accession numbers FJ872517 to FJ872521. The sequences of strain 788BRRJ were deposited in GenBank under accession numbers HQ418340 to HQ418343.

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) PRODOC 1669/2008, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) of Brazil, and the Fogarty International Program in Global Infectious Diseases (grant TW006563) of the National Institutes of Health. We declare no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. **de Beaufort, A. J., A. T. Bernards, L. Dijkshoorn, and C. P. A. van Boven.** 1999. *Acinetobacter junii* causes life-threatening sepsis in preterm infants. *Acta Paediatr.* **88**:772–775.
3. **Dijkshoorn, L., A. Nemeč, and H. Seifert.** 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:939–951.
4. **Grundmann, H. J., et al.** 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3071–3077.
5. **Jajoo, M., V. Kumar, M. Jain, S. Kumari, and V. Manchanda.** 2011. Intravenous colistin administration in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**:218–221.
6. **Kim, D., et al.** 2008. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J. Microbiol.* **46**:396–401.
7. **La Scola, B., V. Gundi, A. Khamis, and D. Raoult.** 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **44**:827–832.
8. **Mäder, K., et al.** 2010. Outbreak of septicemic cases caused by *Acinetobacter ursingii* in a neonatal intensive care unit. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**:338–340.
9. **McGrath, E. J., et al.** 2011. An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a neonatal intensive care unit: investigation and control. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **32**:34–41.
10. **Pellegrino, F. L. P. C., et al.** 2002. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2420–2424.
11. **Pessoa-Silva, C. L., et al.** 2002. Infection due to extended-spectrum-β-lactamase producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Infantis in a neonatal unit. *J. Pediatr.* **141**:381–387.
12. **Turton, J. F., J. Shah, C. Ozongwu, and R. Pike.** 2010. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1445–1449.
13. **Watts, J. L., D. E. Lowery, J. F. Teel, and S. Rossbach.** 2000. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* **83**:2373–2379.
14. **Yamamoto, S., and S. Harayama.** 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1104–1109.
15. **Zingg, W., K. M. Postay-Barbe, and D. Pittet.** 2008. Healthcare-associated infections in neonates. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**:228–234.

APÊNDICE B – Termo de aceite de artigo científico na Journal of Dairy Science (2013).

Journal of Dairy Science

Corynebacterium bovis causing clinical and subclinical mastitis and increasing somatic-cell count

Langoni, H.; Guimarães, F. F., Wanderley, G. G.; Ribeiro, M. G.; Baio, P. V. P.; Ramos, J. N.; Mota, H. F., Hirata Jr, R.; Vieira, V. V.; Mattos-Guaraldi, A. L..

Abstract

Bovine mastitis remains the most economically important disease affecting dairy cows. Considering the existing correlation among infection, somatic cell count (SCC) and milk production, there is a decrease in dairy production. Bacteria of the genus *Corynebacterium* spp., especially *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*), are frequently isolated from bovine mastitis although there are divergent reports about the role of this pathogen in bovine mastitis. In the present study we report the presence of *C. bovis* strains from milk exhibiting increased SCC of 12 cows with subclinical and clinical mastitis during an outbreak in a farm located in the municipality of São Pedro, SP, Brazil. Irregular Gram-positive bacilli isolated in pure cultures underwent conventional biochemical tests which generated indefinite phenotypic profiles (*Corynebacterium mastitidis/C.bovis*). API-Coryne System 3.0 identified all the milk isolates as *C. bovis* (code number 4501014; 99.9% confidence level). Phylogenetic analysis based on *16S rRNA* and *rpoB* sequences confirmed the identification of the strains as *C. bovis*. Data indicated that *C. bovis* clinical relevance should not be underestimated. Laboratorial misidentification may occur when using conventional phenotypic identification 46 procedures.

05-May-2013

Dear Paulo Vitor Baio:

A manuscript titled *Corynebacterium bovis* causing clinical and subclinical mastitis and increasing somatic-cell count (JDS-13-6994) has been submitted by Prof. Hélio Langoni to the Journal of Dairy Science.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Thank you for your participation.

Sincerely,

Journal of Dairy Science Editorial Office.



Corynebacterium bovis causing clinical and subclinical mastitis and increasing somatic-cell count

Journal:	<i>Journal of Dairy Science</i>
Manuscript ID:	JDS-13-6994
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	05-May-2013
Complete List of Authors:	Lanqoni, Hélio; São Paulo State University, Department of Veterinary Hygiene and Public Health Guimarães, Felipe; São Paulo State University, Department of Veterinary Hygiene and Public Health Wandelely, Guido; São Paulo State University, Department of Veterinary Hygiene and Public Health Garcia, Márcio; São Paulo State University, Department of Veterinary Hygiene and Public Health Mattos-Guaraldi, Ana Luiza; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance-LDCIC Baio, Paulo Vítor; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance-LDCIC; Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, National Institute for Quality Control in Health (INCQS); Chemical and Pharmaceutical Laboratory of the Army/LQFEx, Ramos, Juliana; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance-LDCIC; Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, National Institute for Quality Control in Health (INCQS) Mota, Hiqor; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance-LDCIC Vieira, Verônica; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance-LDCIC; Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, National Institute for Quality Control in Health (INCQS)
Key Words:	<i>Corynebacterium bovis</i> , mastitis, sequencing of genes, 16S rRNA, rpoB

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO A – Certificado de participação no 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia



25º Congresso Brasileiro de Microbiologia

Área: Microbiologia Clínica (Divisão A)

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BASTONETES GRAM POSITIVOS IRREGULARES E ACTINOMICETOS AERÓBIOS

Paulo Victor Pereira Baio (INCQS/FIOCRUZ); Koko Otsuki (IOC/FIOCRUZ); Thereza Camello (UERJ); Rafael Hirata-junior (UERJ); Ana Luiza Mattos-guaraldi (UERJ); Veronica Viana Vieira (INCQS/FIOCRUZ)

Resumo

Os bastonetes Gram positivos irregulares (BGPIs) e actinomicetos aeróbios têm origem ambiental ou estão presentes na microbiota humana e de alguns animais. Algumas espécies destes grupos são patógenos clássicos para o homem como *Corynebacterium diphtheriae*, agente da difteria, e para animais, o *Rhodococcus equi* que causa doença pulmonar em potros. Alguns gêneros destes microrganismos têm emergido como importantes patógenos principalmente em pacientes imunossuprimidos e em pacientes imunocompetentes submetidos a procedimentos invasivos e cateterismo vascular associados a infecções nosocomiais. Os (BGPIs) e actinomicetos aeróbios compõem um grupo de espécies bacterianas que apresenta uma grande diversidade fenotípica que torna a identificação convencional bastante limitada, sendo recomendada na maioria dos casos, a utilização de metodologias complementares como técnicas moleculares para fornecer acurada identificação. Neste estudo analisamos 26 amostras de (BGPIs) e actinomicetos não identificados por métodos fenotípicos. As amostras foram provenientes das coleções de culturas do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Médica e do Setor de Identificação Bacteriana do INCQS. A análise da seqüência do gene 16S rRNA identificou o gênero de 12 amostras (46,15 %) e a espécie de 13 amostras (50 %). A amostra 1934 foi identificada apenas como pertencente a família *Corynebacteriaceae*, a análise indica que esta pertence a um gênero e espécie ainda não descritos. Cinquenta por cento das amostras analisadas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Corynebacterium sp.*, 11,53% como pertencentes aos gêneros *Brevibacterium sp* e *Gordonia sp.*, 7,69% pertencentes aos gêneros *Microbacterium sp.* e *Rhodococcus sp.* e 3,84% pertencentes aos "taxa" *Arthrobacter sp.* e *Dermabacter hominis*. Este estudo mostra a importância da utilização da análise da seqüência do gene 16S rRNA para identificação de bastonetes Gram positivos irregulares e actinomicetos aeróbios não identificados por metodologias fenotípicas.

Apoio: FAPERJ e PAPES V

Palavras-chave: 16S rRNA, Actinomicetos, BGP irregular, Caracterização Molecular, Identificação

ANEXO B – Certificado de participação no 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia

**Poster (Painel)**
1572-1 Caracterização *Streptomyces* e *Microbacterium* Provenientes de Áreas Limpas Utilizando a Metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis).

Autores: **Paulo Victor Pereira Baio** (FIOCRUZ-INCQS - Fundação Oswaldo Cruz - INCQSUERJ - Universidade do Estado do Rio de JaneiroLQFEX - Laboratório Químico-Farmacêutico do Exército) ; **Ana Luiza Mattos Guaraldi** (UERJ - Universidade do Estado do Rio de Janeiro) ; **Verônica Viana Vieira** (FIOCRUZ-INCQS - Fundação Oswaldo Cruz - INCQS)

Resumo

Os gêneros *Streptomyces* e *Microbacterium* são encontrados em diversos ambientes e foram os mais identificados dentre os bastonetes Gram positivos irregulares encontrados em áreas limpas. O INCQS/FIOCRUZ realiza ensaios de esterilidade de produtos farmacêuticos em áreas limpas como recomendado pela Farmacopéia Brasileira, assim como o controle e a caracterização da microbiota destes ambientes. Algumas espécies do gênero *Microbacterium* têm emergido como patógeno em pacientes imunossuprimidos e em pacientes imunocompetentes submetidos a procedimentos invasivos. A identificação das espécies destes gêneros bacterianos é bastante complexa devido a grande diversidade que apresentam. A utilização da metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) tem sido empregada em alguns estudos para fornecer identificação acurada destes gêneros bacterianos. Neste estudo analisamos a sequência dos genes *recA*, *rpoB*, *gyrB*, *atpD* e *trpB* de 24 amostras bacterianas dos gêneros *Streptomyces* e *Microbacterium* provenientes de áreas limpas. Estas amostras não puderam ser identificadas utilizando metodologias fenotípicas e o gênero bacteriano foi determinado pela análise das sequências do gene 16S rRNA. A utilização da metodologia de MLSA proporcionou a identificação da maioria das espécies do gênero *Microbacterium*. Para as amostras do gênero *Streptomyces* a metodologia de MLSA identificou apenas 42% das amostras, uma vez que este gênero apresenta mais de 576 espécies e o banco de dados existente (<http://pubmlst.org/streptomyces>) ainda é insuficiente para esta finalidade. Este estudo permitiu a avaliação da metodologia de MLSA para a identificação das espécies dos gêneros analisados provenientes de áreas limpas. Apoio: FAPERJ e PAPES V- CNPq

ANEXO C – Certificado de participação no 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia



Poster (Painel)

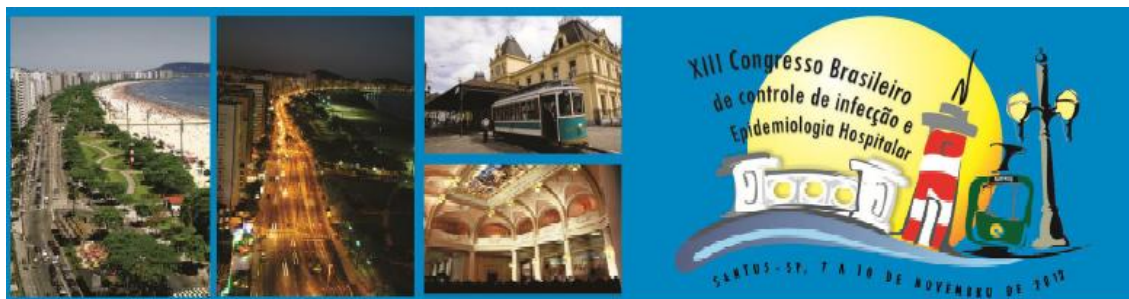
1946-1 **Esquema de triagem no diagnóstico diferencial de amostras clínicas de *Corynebacterium striatum***

Autores: Higor Franceschi Mota (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO) ; Debora Leandro Rama Gomes (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO/IFRJ - INSTITUTO FEDERAL DO RIO DE JANEIRO) ; **Paulo Victor Pereira Baio** (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO/INCQS/FIOCRUZ - INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE DE SAÚDE) ; Louisy Sanches dos Santos (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO) ; Lincoln de Oliveira Sant'anna (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO) ; Juliana Nunes Ramos (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO) ; João Paulo Duarte Guimarães (IFRJ - INSTITUTO FEDERAL DO RIO DE JANEIRO) ; Eric Araújo Borges Barbosa (IFRJ - INSTITUTO FEDERAL DO RIO DE JANEIRO) ; Cassius de Souza (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO) ; Thereza Cristina Ferreira Camello (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO) ; Raphael Hirata Junior (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO) ; Verônica Viana Vieira (INCQS/FIOCRUZ - INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE DE SAÚDE) ; Ana Luiza de Mattos-guaraldi (UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO)

Resumo

Diversas espécies de corinebactérias, incluindo *Corynebacterium striatum*, podem fazer parte da microbiota em superfícies cutâneo-mucosas de humanos e outros animais. Entretanto, nos últimos anos, o *C. striatum* vem ganhando importância como patógeno oportunista relacionado com quadros de endocardite, artrite, cistite e doenças pulmonares. Devido à sua resistência intrínseca à maioria dos antimicrobianos recomendados no tratamento das infecções pelos demais corineformes, o *C. striatum* vem recebendo cada vez mais atenção no controle das infecções nosocomiais dentro do gênero. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um esquema para triagem laboratorial utilizando os seguintes testes fenotípicos: reação de CAMP, susceptibilidade ao agente vibriostático O/129 e a capacidade de fermentação da glicose a 20°C e 42°C. Doze amostras oriundas de surto epidêmico ocorrido em hospital universitário do Rio de Janeiro foram submetidas à caracterização fenotípica através de métodos convencionais e semi-automatizados como o *Gram Positive ID Kit BBL Crystal™ Identification System* e o *API Coryne System REF20900* (BioMérieux™) e ensaios de sequenciamento gênico (*RpoB*). Os testes bioquímicos convencionais inicialmente conduziram à identificação até o grupo Complexo *xerosis-minutissimum-striatum-amycolatum* (XMSA) e quando previamente submetidos aos testes em questão (reação de CAMP, susceptibilidade ao agente vibriostático O/129 e a capacidade de fermentação da glicose a 20°C e 42°C) se mostraram satisfatórios para concluir o diagnóstico laboratorial da espécie *C. striatum*. A análise pelos sistemas semi-automatizados demonstrou que apenas o *Gram Positive ID Kit BBL Crystal™ Identification System* foi capaz de identificar as amostras testadas como *C. striatum*. Os resultados foram confirmados pelo sequenciamento gênico. Os dados permitiram concluir que os testes CAMP, susceptibilidade O/129 e a fermentação da glicose a 20°C e 42°C auxiliam a diferenciar a espécie *C. striatum* das demais amostras clínicas pertencentes ao Complexo *xerosis-minutissimum-striatum-amycolatum* (XMSA).

ANEXO D – Certificado de participação no XII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar.



Santos – São Paulo
08 de novembro de 2012

Caracterização de amostras de *Corynebacterium striatum* oriundas de surto epidêmico em ambiente hospitalar, Rio de Janeiro, Brasil.

Mota HF, **Baio PVP**, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Souza LP, Farias YV, Sant'Anna LO, Santos SS, Santos LS, Souza MC, Louredo SL, Bello AR, Moreira LO, Meira MSM, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL.