



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Lincoln de Oliveira Sant'Anna

**Caracterização de corinebactérias isoladas de infecções urinárias e
investigação de mecanismos de virulência de *Corynebacterium mycetoides***

Rio de Janeiro

2016

Lincoln de Oliveira Sant'Anna

Caracterização de corinebactérias isoladas de infecções urinárias e investigação de mecanismos de virulência de *Corynebacterium mycetoides*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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: Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Rio de Janeiro

2016

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

S231 Sant'Anna, Lincoln de Oliveira.

Caracterização de corinebactérias isoladas de infecções urinárias e investigação de mecanismos de virulência de *Corynebacterium mycetoides* / Lincoln de Oliveira Sant'Anna. – 2016.

105 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi.

Coorientadora: Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna.

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

1. *Corynebacterium* - Teses. 2. Infecções urinárias- Teses. 3. Infecções por *Corynebacterium*. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Sant'Anna, Louisy Sanches dos Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.871.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Lincoln de Oliveira Sant'Anna

Caracterização de corinebactérias isoladas de infecções urinárias e investigação de mecanismos de virulência de *Corynebacterium mycetoides*

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

Aprovado em 18 de outubro de 2016.

Coorientadora: Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Banca Examinadora:

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

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Cíntia Silva dos Santos

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dr. Carlos Alberto de Souza Martins

Instituto Nacional do Câncer - INCA

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida. Minha esposa, por toda sua dedicação e amor durante todos esses anos e por me fazer sentir e me presentear com o verdadeiro amor. Por me transformar em um homem digno e sábio. Por me permitir cuidar e te amar a cada dia mais. Por todos os sorrisos e alegrias que vivemos e que tenho certeza que viveremos juntos. E sobretudo por ser essa mulher maravilhosa, guerreira e amorosa que és. E por último e não menos importante, à você, minha filha, que mesmo tão nova pôde me transmitir uma fortaleza e vontade de concluir este trabalho. À você que me ilumine com seu sorriso banguela e seus carinhos afáfeis. Papai já te amava antes de tudo. Dedico a vocês não só esse trabalho, mas minha vida e existência até além dessa vida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar e me conduzir nos caminhos da vida.

À Nossa Senhora, por nunca me abandonar como filho e sempre estar a minha frente.

Totus Tuus.

Aos meus pais, Maria Célia e Gil Afonso (*in memoriam*) por serem minha base de vida.

À minha esposa, Louisy, por ter me dado seu coração e sua luz para iluminar minha vida. Obrigado por tudo, tudo mesmo. Eu te amo.

À minha filha, Sophia, por ser luz, beleza, fortaleza, amor, felicidade, carinho e esperança na minha vida. Papai te ama.

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

À minha orientadora, Prof^a. Ana Luíza de Mattos Guaraldi, por confiar e apoiar durante todos esses anos de estudo.

Ao Prof. Raphael Hirata Júnior, por sua dedicação, ajuda e seus preciosos conselhos durante todos estes anos.

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

À Elisabete Cappelli, que em tão pouco tempo conseguiu mostrar sua imensa amizade e carinho. Uma grande mãe, amiga e companheira de experimentos. Obrigado, por me fazer enxergar e não desistir de tudo e de todos.

Aos demais colegas do laboratório, Monica, Cíntia, Cecília, Liliane, Eliane, e todos os demais, pelo companheirismo.

Aos professores de toda a minha vida, pela motivação, conhecimento e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – PGCM/FCM/UERJ, por permitir que fizesse de um sonho realidade.

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

Não tenhais medo!
Abri, melhor, escancarai as portas a Cristo!

Papa João Paulo II

RESUMO

SANT'ANNA, Lincoln de Oliveira. **Caracterização de corinebactérias isoladas de infecções urinárias e investigação de mecanismos de virulência de *Corynebacterium mycetoides***. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Corynebacterium têm sido cada vez mais relacionadas a casos de infecções invasivas, incluindo em indivíduos imunocomprometidos. No entanto, este grupo de micro-organismos permanece frequentemente identificado erroneamente e/ou descartado como contaminantes, principalmente devido às novas espécies. Além disso, os limitados ensaios baseados em culturas e métodos de identificação tipicamente utilizados em laboratórios de microbiologia contribui para este problema. A Infecção do trato urinário (ITU) é considerada a segunda infecção bacteriana mais comum. Uma ampla gama de fatores pode aumentar a susceptibilidade a ITU, incluindo idade, sexo e insuficiência renal. No presente estudo foram descritos aspectos microbiológicos e epidemiológicos de 69 cepas de *Corynebacterium spp.* previamente isoladas a partir de urinoculturas de pacientes com ITU atendidos em um hospital universitário brasileiro. Além disso, pela primeira vez, verificou-se o potencial patogênico para o trato urinário humano de *Corynebacterium mycetoides*. As estirpes foram identificadas pelos métodos fenotípicos convencionais. A susceptibilidade bacteriana a 14 agentes antimicrobianos foi verificada pelo método de difusão em disco. Os resultados indicaram que os casos de ITU relacionados com corinebactérias foram mais observados entre pacientes ambulatoriais (82,61%) atendidos nas unidades de transplante renal (50,72%) e urologia (23,19%). Os microrganismos foram mais observados no sexo feminino (71,04%) e na faixa etária entre 41-60 anos (55,07%). *Corynebacterium spp.*, correspondente a $> 10^3$ UFC/ml, foram isolados a partir de culturas monomicrobiana (41%) e polimicrobiana (60%), sendo os estafilococos coagulase-negativo (23,53% deles, cepas multirresistentes - MDR) com maior frequência (41,46 %). A identificação fenotípica convencional identificou o complexo *C. xerosis/striatum/amycolatum/ minutissimum* na maioria (n=40; 57,97%) das infecções, além de *C. propinquum* (n=02), *C. afermentans* (n=08), *C. jeikeium* (n=01), *C. coyleae* (n=01), *C. glucuronolyticum* (n=01), *C. urealyticum* (n=01), CDC Grupo G (n=01) e *Corynebacterium spp.* (n=14). A maior parte dos isolados foram identificados como MDR. Devido à variabilidade de perfis fenotípicos, uma parte dos isolados não foi possível de serem identificados ao nível de espécie, exigindo técnicas mais sofisticadas. A cepa 2450 isolada de uma paciente previamente submetida a transplante renal, com morfologia colonial atípica (não-hemolítica, brilhante e colônias amareladas), foi inicialmente identificada como *Corynebacterium sp.*. A cepa também foi analisada pelos sistemas API Coryne, RapID CB e BBL Cristal, além da espectrometria de massa e ensaios de genotipagem. O MALDI-TOF e o sequenciamento dos genes *16S* rRNA e *rpoβ* foram os únicos eficazes na identificação, identificando a cepa como *C. mycetoides*. O potencial de virulência de *C. mycetoides* foi demonstrado pela expressão do perfil MDR, a formação de biofilmes em superfícies de cateteres e os efeitos de citotoxicidade em *Caenorhabditis elegans*. *C. mycetoides* também foi capaz de aderir e sobreviver dentro de células epiteliais de rim (Vero). Concluindo, as corinebactérias, incluindo *C. mycetoides* devem ser incluída entre os uropatógenos. Os recentes avanços tecnológicos facilitam a identificação de novos agentes etiológicos. A necessidade de dados precisos e atualizados é evidente, particularmente à luz das preocupações em relação à resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Infecções do trato urinário. *Corynebacterium mycetoides*. Úlcera tropicalóide de Castellani. *Corynebacterium sp.*

ABSTRACT

SANT'ANNA, Lincoln de Oliveira. **Characterization of corynebacteria isolated from urinary tract infections and research virulence mechanisms *Corynebacterium mycetoides***. 2016. 105 f. Dissertation (Master of Medical Sciences) - Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Corynebacterium species have been increasingly related to cases of invasive infections, including immunocompromised individuals. However, this group of microorganisms remains frequently misidentified and/or dismissed as contaminants, partially due to the fact that many new taxa of coryneform bacteria have been described. Moreover, limited culture-based assays and identification methods typically utilized in microbiology laboratories contribute to this problem. Urinary tract infections (UTI) are considered the second most common bacterial infection. A wide range of factors may increase susceptibility to UTI, including age, gender and renal insufficiency. In the present study were described microbiological and epidemiological aspects of 69 strains of *Corynebacterium* spp. previously isolated from urine samples of UTI patients attended in a Brazilian university hospital. Additionally, we firstly verified the pathogenic potential to the human urinary tract of *Corynebacterium mycetoides*. Corynebacterial strains were identified by conventional phenotypic methods. Bacterial susceptibility to 14 antimicrobial agents was verified by the disk diffusion method. Results indicated that cases of ITU related to corynebacteria were mostly observed among outpatients (82.61%) attended in the kidney transplant (50.72%) and urology units (23.19%). Microorganisms were mostly observed among females (71.04%) and 41 to 60 year-old age group (55.07%). *Corynebacterium* spp., corresponding to $\geq 10^3$ UFC/ml, were isolated from monomicrobial (41%) and polymicrobial (60%) infectious episodes, with coagulase-negative staphylococci (including 23.53% multidrug resistant - MDR strains) being isolated most frequently (41.46%). Classical phenotypic analyses identified *Corynebacterium striatum/amycolatum/xerosis/minutissimum* complex in most (n=40; 57.97%) opportunities, in addition to *C. propinquum* (n=02), *C. afermentans* (n=08), *C. jeikeium* (n=01), *C. coyleae* (n=01), *C. glucuronolyticum* (n=01), *C. urealyticum* (n=01), CDC Grupo G (n=01) and *Corynebacterium* sp. (n=14). Corynebacterial urine isolates were mostly identified as MDR. Due to variability of phenotypic profiles, a range of urine isolates were unable to be identified to species level, requiring more sophisticated techniques. The 2450 strain isolated from patient previously submitted to renal transplantation that presented atypical colony morphology (non-hemolytic, shiny and yellowish colonies), initially identified as *Corynebacterium* sp., was also analyzed by API Coryne, RapID CB and BBL Crystal, mass spectrometry and genotyping assays. MALDI-TOF and 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing were effective in identifying it as *C. mycetoides*. Virulence potential of *C. mycetoides* was demonstrated by the expression of MDR profile, biofilm formation on catheters surfaces and cytotoxicity effects on *Caenorhabditis elegans*. *C. mycetoides* was also able to adhere to and survive within kidney epithelial (Vero) cells. In conclusion, varied corynebacterial species, including *C. mycetoides* should be included among uropathogens. Recent advances in molecular biology may facilitate the identification of new etiologic agents for UTI. The need for accurate and updated population surveillance data is apparent, particularly in light of concerns regarding antimicrobial resistance.

Keywords: Urinary tract infection. *Corynebacterium mycetoides*. Castellani's "tropicaloid" ulcer. *Corynebacterium* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas de pacientes tratados em diferentes setores e sub-setores hospitalares (HUPE/UERJ) durante o período de janeiro de 2011 a janeiro de 2013.....	48
Figura 2 –	Números de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas relacionados com as faixas etárias dos pacientes atendidos no HUPE/UERJ (Jan 2011-Jan 2013).....	50
Figura 3 –	Número (%) de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas de pacientes atendidos em diversos setores do HUPE/UERJ (Jan 2011-Jan 2013).....	51
Figura 4 –	Características morfológicas e bioquímicas de <i>Corynebacterium mycetoides</i> 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado renal.....	58
Figura 5 –	Aderência e produção de biofilme pela amostra <i>Corynebacterium mycetoides</i> 2450 nas superfícies do vidro e poliestireno.....	64
Figura 6 –	Micrografias dos tapetes bacterianos formados após o rolamento de diferentes tipos de catéteres contendo o biofilme da amostra <i>Corynebacterium mycetoides</i> 2450.....	65
Figura 7 –	<i>C. elegans</i> como modelo experimental <i>in vivo</i> para avaliação do potencial patogênico de <i>Corynebacterium mycetoides</i>	67
Figura 8 –	Interação de <i>Corynebacterium mycetoides</i> 2450 com células epiteliais renais (Vero) por diferentes períodos de incubação.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Iniciadores utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento dos genes conservados 16S rRNA e <i>rpoB</i> para a identificação da amostra 2450 isolada de urinocultura de paciente submetido a transplante renal atendido no HUPE/UERJ.....	40
Tabela 2 –	Aspectos epidemiológicos e microbiológicos de 28 amostras de corinebactérias isoladas em cultura pura oriundas de urinoculturas de pacientes com quadro de infecção urinária atendidos em diversos setores do HUPE/UERJ (Jan 2011-Jan 2013).....	46
Tabela 3 –	Aspectos epidemiológicos e microbiológicos de 41 amostras de corinebactérias isoladas em associação com outros micro-organismos oriundas de urinoculturas de pacientes com quadro de infecção urinária atendidos em diversos setores do HUPE/UERJ (Jan 2011-Jan 2013).....	48
Tabela 4 –	Perfis de susceptibilidade aos 14 agentes antimicrobianos testados pelo teste de difusão em disco de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013).....	52
Tabela 5 –	Características fenotípicas de amostras relacionadas ao complexo XSMA isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013).....	54
Tabela 6 –	Perfis fenotípicos de amostras não relacionadas ao complexo XSMA isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013).....	56
Tabela 7 –	Resultados das análises fenotípicas convencional e semi-automatizadas e moleculares de <i>Corynebacterium mycetoides</i> 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado renal.....	59
Tabela 8 –	Resultados das análises moleculares de <i>Corynebacterium mycetoides</i> 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado renal.....	61
Tabela 9 –	Perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos determinada pelo método disco difusão de <i>Corynebacterium mycetoides</i> 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado renal.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -GLU	α -glucosidase
AMB	Ambulatório
Amp	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção Americana de Culturas Tipo
β -GAL	β -galactosidase
BGNF	Bacilo Gram-Negativo Fermentador
BGNNF	Bacilo Gram-Negativo Não Fermentador
BGPI	Bastonetes Gram-positivos Irregulares
β -GUR	β -glucuronidase
β -NAG	β -N-acetilglucosaminidase
BR	Brasil
CAB	Base de Ágar Sangue
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
Cef	Cefotaxima
CGLAB/SVS/MS	Coordenadoria Geral de Laboratórios da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
Cip	Ciprofloxacina
CLED	Agar de Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos
CLSI	Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial
CTA	Ágar Cistina Tripticaseina
DIP	Doenças Infecto-Parasitárias
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DO _c	Densidade ótica do controle negativo
EAS	Elementos Anormais e Sedimentoscopia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

ENF	Enfermaria
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Fg	Fibrinogênio
FR	França
GB	Grã-Bretanha
Gen	Gentamicina
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
Imi	Imipenem
ITU	Infecções do Trato Urinário
LABAC	Laboratório de Bacteriologia
LC	Linfadenite caseosa
LDCIC	Laboratório de Corinebactérias de Importância Clínica
Lin	Lincomicina
Lzd	Linezolida
MALDI-TOF	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo
MDR	Multirresistente
MEM	Meio essencial de Eagle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NESA	Núcleo de Estudos da Saúde do Adolescente
NGM	Meio de crescimento de nematódeo
NI	Não Informado
Nit	Nitrofurantoína
NT	Não Testado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAL	Fosfatase Alcalina
PBS	Solução salina fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pen	Penicilina
PLD	Fosfolipase D
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
PyrA	Pirrolidonil-Arilamidase

PYZ	Pirazinamidase
Rif	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rRNA	RNA ribossomal
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
SCN MDR	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa Multirresistente
Sulf/Trim	Sulfametoxazol com trimetoprima
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TD	Toxina Diftérica
Tet	Tetraciclina
TSA	Ágar Trypticaseina de Soja
TSB	Caldo Trypticaseina de Soja
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
US	Estados Unidos da América
Van	Vancomicina
XSMA	<i>xerosis, striatum, minutissimum, amycolatum</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
cm	Centímetro
ml	Mililitro
kDa	Quilodalton
β	Beta
°C	Graus Celsius
h	Hora
\geq	Maior ou igual
U	Unidades Internacionais
μg	Micrograma
min	Minuto
s	Segundo
rpm	Rotação por minuto
μl	Microlitro
mM	Milimolar
pb	Par de bases nitrogenadas
V	Volts
λ	Comprimento de onda
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
M	Molar
\pm	Mais ou menos
\times	Multiplicação
(+)	Reação Positiva Fraca
+	Positivo
-	Negativo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Infecções do trato urinário	18
1.1.1	<u>Fisiopatologia e etiologia das ITU</u>	19
1.1.2	<u>Diagnóstico</u>	21
1.1.2.1	Diagnóstico clínico	21
1.1.2.2	Diagnóstico laboratorial	22
1.1.3	<u>Tratamento e prevenção</u>	23
1.2	Gênero <i>Corynebacterium</i>	23
1.2.1	<u>Patógenos potencialmente produtores de toxina diftérica - <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, <i>Corynebacterium ulcerans</i> e <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i></u>	24
1.2.2	<u>Patógenos não produtores de toxina diftérica</u>	25
1.3	Fatores de virulência de corinebactérias	28
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral	33
2.2	Objetivo Específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
4	RESULTADOS	44
4.1	Estudo dos casos de ITU relacionados com corinebactérias ocorridos em pacientes atendidos no HUPE/UERJ (2011-2013)	44
4.2	Identificação e determinação do potencial patogênico de espécie rara de corinebactéria a partir de urinocultura de paciente com ITU atendido no HUPE/UERJ	57
4.2.1	<u>Identificação bacteriana</u>	57
4.2.1.1	Análise empregando testes fenotípicos convencionais	57
4.2.1.2	Análise fenotípica por sistemas semi-automatizados	57
4.2.1.3	Identificação molecular por MALDI-TOF e sequenciamento de genes conservados 16S rRNA e rpoB	60
4.2.2	<u>Avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos através do método de difusão em ágar</u>	60

4.2.3	<u>Análise do potencial patogênico da amostra <i>C. mycetoides</i> 2450</u>	60
4.2.3.1	Aderência e produção de biofilme em superfícies abióticas diversas	60
4.2.3.2	Infecção de nematódeos <i>C. elegans</i> por <i>C. mycetoides</i>	63
4.2.3.3	Interação de <i>C. mycetoides</i> com células de linhagem contínua Vero	66
5	DISCUSSÃO	69
	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A – Produção científica durante o período probatório.....	94
	APÊNDICE B – Produção científica durante o período do mestrado.....	96

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) são infecções comuns que acometem homens e mulheres de todas as faixas etárias e apresentam variabilidade quanto às formas de apresentação e intensidade do quadro. A ITU é considerada a doença infecciosa bacteriana mais comum na população geral, tanto em nível comunitário quanto em nível hospitalar, representando uma das causas mais comuns de consultas médicas em todo o mundo (GUPTA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010).

Apesar do introito vaginal e da porção distal da uretra abrigarem uma microbiota que inclui na sua composição algumas espécies dos gêneros estreptococos, estafilococos e lactobacilos além de micro-organismos corineformes, são os bacilos Gram-negativos entéricos, incontestavelmente, os mais frequentes agentes etiológicos de ITU. Dentre estes, a espécie *Escherichia coli* é a mais frequentemente isolada e que tem seus fatores de virulência mais bem investigados. *E.coli* tem sido relacionada com 75% a 80% dos casos de ITU, tanto em pacientes hospitalizados quanto em pacientes não hospitalizados (FALAGAS et al., 2010; PALLET; HAND, 2010) e contribuem para uma taxa significativamente alta de morbidade. Outros bacilos Gram-negativos entéricos como *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* são considerados agentes causadores de ITU (KONINGSTEIN et al., 2014).

O número de casos de infecções humanas relacionadas com algumas espécies do gênero *Corynebacterium* tem sido crescente tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, podendo levar a óbito pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. O aparecimento de amostras multirresistentes e o aumento do número de casos de infecções de origens diversas, algumas fatais, têm contribuído para aumentar o interesse por esse grupo de bastonetes Gram-positivos irregulares (BGPI). As apresentações clínicas das infecções dependem da espécie envolvida, tendo como principais sítios de infecção o trato urinário e respiratório inferior, sítios intravenosos (cateter e sangue), liquor, líquido peritoneal, feridas cirúrgicas, além de lesões cutâneas, abscessos e secreção ocular (CAMELLO et al, 2002; FUNKE; BERNARD, 2011; MARTINS et al, 2009,). Entretanto, o potencial patogênico dos micro-organismos corineformes permanece subestimado pelos profissionais de saúde. Na maioria dos laboratórios esses patógenos permanecem sendo descartados como meros contaminantes.

Atualmente, entre os membros do gênero *Corynebacterium*, *Corynebacterium urealyticum* permanece descrito como o principal agente causador de ITU. Contudo, tem sido observado um aumento no isolamento de outras espécies deste gênero em urinoculturas,

sobretudo naquelas provenientes de pacientes imunocomprometidos, de indivíduos com longo tempo de internação ou de transplantados (AUDARD et al., 2003; CAMELLO et al., 2009; CHOE et al., 2012; DIAS et al., 2010; FERRER et al., 2001; FUNKE et al., 1998; HERTIG et al., 2000; LÓPEZ et al., 2009; VEDEL et al., 2006; VERDAGUER et al., 2008; VILLANUEVA et al., 2002; PRETE et al., 2008).

A identificação das corinebactérias é um dos grandes desafios que os laboratórios clínicos enfrentam devido principalmente a enorme diversidade de espécies microorganismos. A reclassificação taxonômica das corinebactérias tem sido freqüente conforme aumenta o grau de conhecimento relativo às suas características fenotípicas e genotípicas. Dificultando ainda mais a valorização microbiológica e clínica do isolamento, a escolha do esquema de identificação para o diagnóstico laboratorial, a identificação de gênero e espécies além da antibioticoterapia.

Ao contrário do observado para *E. coli*, escassas são as pesquisas relacionadas às ITU causadas por diferentes espécies de corinebactérias no ambiente hospitalar em países emergentes, aos procedimentos de diagnóstico laboratorial que permitam a correta identificação desses patógenos além dos possíveis fatores de virulência envolvidos nesses processos.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Infecções do trato urinário

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2004) até 2003 os sinais e sintomas relacionados a estas infecções foram responsáveis por cerca de 3 a 4% das consultas médicas anuais em mulheres no Brasil. Nos Estados Unidos da América, as ITU resultam, em média, 3.600.000 consultas médicas anuais e mais de 100.000 hospitalizações (GUPTA et al., 2011). No Reino Unido, elas chegam a representar 23% das infecções e estão associadas a aproximadamente 8% das bacteremias por uso de cateter (SIGN, 2012). Pesquisas revelam que 50% das mulheres e 12% dos homens irão vivenciar ao menos um episódio de infecção urinária durante sua vida. Mais do que isso, aproximadamente 25% destas mulheres apresentarão infecções recorrentes entre 6 e 12 meses (FOXMAN; BROWN, 2003; FOXMAN, 2010; MAHESWARI et al., 2013).

As infecções urinárias resultam de uma série de complexas interações entre os uropatógenos e o hospedeiro, o qual poderá manifestá-las de forma aguda ou crônica, ou permanecer assintomático (HORVATH JR et al. 2012; SMELTZER; BARE, 2005). Elas são classificadas em ITU inferior, quando acometem a uretra (uretrite), bexiga (cistite) e próstata (prostatite), e ITU superior, quando comprometem a pelve renal (pielonefrite), os rins (nefrite intersticial) e causam abscessos renais (SMELTZER; BARE, 2005).

As ITU também são classificadas em complicadas e não complicadas. A ITU é classificada como não complicada quando ocorre em paciente com estrutura e função do trato urinário normal e é adquirida fora de ambiente hospitalar. As condições que se associam à ITU complicada incluem as de causa obstrutiva (hipertrofia benigna de próstata, tumores, urolitíase, estenose de junção uretero-piéllica, corpos estranhos, etc); anátomofuncionais (bexiga neurogênica, refluxo vesico-ureteral, rim-espongiomedular, nefrocalcinose, cistos renais, divertículos vesicais); metabólicas (insuficiência renal, *diabetes mellitus*, transplante renal); uso de catéter de demora ou qualquer tipo de instrumentação; derivações ileais (HEILBERG; SCHOR, 2003).

As ITU podem ocorrer em todas as idades, acometendo preferencialmente um dos sexos em cada faixa etária, com exceção da terceira idade. Durante o primeiro ano de vida, o sexo masculino é o mais atingido em virtude da maior incidência de malformação uretral nessa população. Já durante a infância, as ITU acometem com maior incidência o sexo

feminino devido ao menor comprimento da uretra neste grupo e ao refluxo de urina. Na fase adulta, a ocorrência de ITU aumenta, mas o panorama se mantém com o predomínio do sexo feminino em razão do início das atividades sexuais. Em adultos do sexo masculino as ITU são raras e comumente associadas a infecções prostáticas subjacentes. Nos idosos, episódios de ITU são extremamente comuns, independentemente do sexo, seja de forma sintomática ou assintomática, principalmente devido à mucosa vaginal atrófica nas mulheres e à hiperplasia prostática nos homens. Independentemente da faixa etária, a gestação, o *diabetes mellitus*, a imunossupressão e outras doenças de base são fatores que favorecem o aparecimento destas infecções (FOXMAN, 2003; GONZÁLEZ-CHAMORRO et al., 2012; KONEMAN et al., 2006; NICOLLE, 2001).

1.1.1 Fisiopatologia e etiologia das ITU

O trato urinário conta com diversos mecanismos de defesa que dificultam o estabelecimento dos micro-organismos e, assim, o progresso da infecção. O efeito mecânico da micção, a concentração osmótica da urina, o baixo pH, a ação bactericida dos fluidos prostáticos, a camada de muco que recobre a mucosa vesical, a presença de citocinas, células fagocitárias e anticorpos, dentre outros, são alguns desses fatores (ALMEIDA et al., 2007; ANVISA, 2004; PALLET; HAND, 2010; SHUMAM; CHENOWETH, 2010).

Para que a infecção aconteça é preciso que o micro-organismo uropatogênico supere estas defesas do hospedeiro, ganhando acesso à bexiga, fixando-se no epitélio e colonizando-o afim de que se consiga manter e iniciar o processo infeccioso. Três vias de acesso ao trato urinário são bem conhecidas: a via ascendente (ou transuretral), pela qual o micro-organismo invade a bexiga através da uretra; a disseminação hematogênica, pela qual o micro-organismo é oriundo da corrente sanguínea; e a extensão direta, em que o micro-organismo tem acesso à bexiga por uma fístula formada a partir do intestino. Dentre as três vias de infecção, a mais comum é a via transuretral. Neste contexto, a uretra feminina por ser mais curta (5 cm) é menos eficaz em deter a infecção quando comparada com a uretra masculina (20 cm). Outro fator que contribui para a incidência aumentada das ITU por esta via é o ato sexual, que facilita o movimento ascendente do micro-organismo até a uretra, sobretudo em mulheres (SMELTZER; BARE, 2005).

As internações hospitalares e a realização de procedimentos que invadem o trato urinário também contribuem para o aparecimento das ITU. Um dos procedimentos mais

frequentes que envolvem a manipulação do trato urinário é o cateterismo vesical. Tal procedimento favorece a penetração do micro-organismo no trato urinário por três distintas formas: no momento da inserção do cateter; através da luz do cateter; e por meio da interface mucosa-cateter. Neste procedimento diversos mecanismos de defesa são comprometidos, sendo um deles a interrupção do funcionamento das glândulas presentes na uretra que secretam produtos com ação bactericida (HOOTON, 2000; JOHANSEN, 2006; SIGN, 2012).

Os fatores que predisõem a colonização dessas espécies entéricas ainda não foram bem compreendidos, mas é sabido que as alterações na microbiota vaginal, a utilização de antibióticos, contraceptivos e as diversas infecções genitais desempenham um papel importante (KONEMAN et al., 2006). Além disso, os próprios micro-organismos possuem diversos mecanismos que lhes permitem aderir às células do trato urinário e também produzir uma série de substâncias que provocam agressão ao epitélio e alteram sua fisiologia, permitindo a ocorrência da infecção. *E. coli*, por exemplo, é capaz de ascender o trato urinário e se fixar através fatores de aderência como fímbria tipo I e fímbria P e adesinas não fimbriais que permitem a adesão e a resistência à eliminação pelo fluxo urinário (JORGENSEN; SEED, 2012).

Outro mecanismo que contribui para o avanço da infecção e que está envolvido com as ITU recorrentes é a formação de biofilme por organismos uropatogênicos (GONZÁLEZ-CHAMORRO et al., 2012; MAHESWARI et al., 2013). Os biofilmes vêm sendo estudados nos últimos 30 anos e têm ganhado importância nos meios científico e clínico em virtude do seu papel em muitas doenças infecciosas, como endocardite, osteomielite, periodontite, sinusite e otite média (DONLAN; COSTERTON, 2002; GOMES et al., 2009; SHARMA; YADAV, 2008), além das ITU.

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

Ao serem formados em estruturas bióticas, como na superfície interna da bexiga, os biofilmes funcionam como verdadeiros reservatórios de micro-organismos e contribuem para a recorrência das infecções, uma vez que dificultam o acesso dos antimicrobianos e anticorpos. Além disso, as superfícies de dispositivos médicos de longa permanência tornam-

se uma excelente plataforma para a formação destas estruturas e, assim, para o desenvolvimento das infecções (CHRISTENSEN et al., 1982; MARRIE; COSTERTON, 1984).

1.1.2 Diagnóstico

1.1.2.1 Diagnóstico clínico

As ITU podem se manifestar por diversos sinais e sintomas, os quais podem ser sistêmicos ou locais, e variáveis de acordo com a idade do indivíduo. Em neonatos e crianças até dois anos, elas podem ser totalmente assintomáticas ou desencadear sintomas inespecíficos como: irritabilidade, diminuição na amamentação, menor desenvolvimento pondero-estatural, diarreia e vômitos, dentre outros. Nas idades superiores a esta, os relatos de sintomas como disúria, frequência e dor abdominal, podem ser descritos (ANVISA, 2004).

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

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

Em pacientes cateterizados é comum observar febre, bacteriúria e outras manifestações clínicas associadas, o que dificulta o diagnóstico de ITU. É importante considerar que somente a febre não é suficiente para concluir o diagnóstico destas infecções. Portanto, outros sinais e sintomas, quando presentes, devem ser considerados, como a sensibilidade costovertebral e dores localizadas que podem irradiar ou não (PALLET; HAND, 2010; SIGN, 2012). Nos casos mais complicados, o choque séptico pode ocorrer devido à sepse urinária. Esses casos são majoritariamente observados em pacientes com longos períodos de hospitalização e/ou que se submeteram à instrumentação do trato urinário, como

por exemplo, com uso prolongado do cateter vesical de demora ou procedimentos cirúrgicos (KONEMAN et al., 2006; SMELTZER; BARE, 2005).

1.1.2.2 Diagnóstico laboratorial

Embora o diagnóstico de ITU seja baseado primeiramente nos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo, diversos exames laboratoriais corroboram o diagnóstico e contribuem para a escolha do tratamento. Em geral, o exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS) é suficiente para determinar a conduta médica. Contudo, a cultura da urina e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos permitem que o micro-organismo seja identificado e traçado a conduta terapêutica (ANVISA, 2004; SIGN, 2012).

Nos indivíduos saudáveis, a urina é estéril, embora a região periuretral seja colonizada por micro-organismos comensais, incluindo os de origem fecal. Isto pode favorecer a contaminação da urina durante a coleta do material biológico para análise laboratorial na investigação da ITU. Neste caso, a infecção é diferenciada da contaminação através de métodos quantitativos de cultura (SMELTZER; BARE, 2005).

Segundo a ANVISA (2004), através do Manual de Microbiologia Médica, a ITU é confirmada quando há o isolamento do micro-organismo em cultura pura, com o crescimento bacteriano igual ou maior que 10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro (ml) de urina colhida em jato médio e de maneira asséptica. Em determinados casos, algumas exceções observadas: em idosos, pacientes com infecções crônicas e em uso de antibióticos, é considerado o crescimento maior ou igual a 10^4 UFC/ml; em culturas realizadas através da coleta por punção suprapúbica, o crescimento maior ou igual a 10^2 UFC/ml é suficiente, tanto em mulheres quanto em homens de qualquer faixa etária (NICOLLE et al., 2005); em homens com sinais e sintomas de ITU, é considerado o crescimento maior ou igual a 10^3 UFC/ml. Embora estas observações sejam suficientes para o diagnóstico, outros dados laboratoriais e clínicos devem ser avaliados juntamente com os resultados da cultura da urina para que seja possível o encerramento do diagnóstico (BAYRAK et al., 2007). Para a realização dessa técnica, os métodos mais utilizados são: o lamino-cultivo, semeadura pelos métodos de *pour-plate* e semeadura com alça calibrada (ANVISA, 2004).

1.1.3 Tratamento e prevenção

As principais questões a serem consideradas nos tratamentos das ITU são a seleção do antimicrobiano a ser escolhido, a duração do tratamento e a presença de critérios que justifiquem a hospitalização, quando aplicável. Dentre os antimicrobianos preconizados estão: nitrofurantoína, sulfametoxazol/trimetopim, fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, betalactâmicos e aminoglicosídeos (GUPTA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010).

É importante mencionar que não existe um agente antimicrobiano que seja considerado o melhor para o tratamento destas infecções. Sua escolha deve ser individualizada, avaliando-se a eficácia, os riscos de efeitos adversos e tendo com base o conhecimento os perfis de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos disponíveis. Outros fatores também devem ser levados em consideração, tais como: o custo e a disponibilidade do medicamento, e fatores específicos do paciente, como a idade, o histórico de alergia medicamentosa, a existência de doenças de base e gravidez (COLGAN; GUPTA et al., 1999; HEILBERG; SCHOR, 2003; RODRIGUES et al., 2010; WILLIAMS, 2011).

1.2 **Gênero *Corynebacterium***

O gênero *Corynebacterium* compreende bacilos Gram-positivos pleomórficos, não formadores de esporos, imóveis, não álcool-ácido resistentes, aeróbios ou anaeróbios facultativos (FUNKE et al., 1997). Atualmente composto por 114 espécies, *Corynebacterium* é o maior gênero dentre o grupo dos corineformes (COLLINS et al., 2001; DSMZ, 2014). Suas espécies são amplamente disseminadas no ambiente, sendo isoladas de solo e vegetais (CHEN, 2004; FUDOU et al., 2002), de humanos (FEURER et al., 2004; FUNKE et al., 1995, 1997, 1998; MERHEJ et al., 2009; RIEGEL et al., 2006; YASSIN, 2007) e de outros animais (COLLINS et al., 2001, 2004; COYLE; LIPSKY, 1990; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL et al., 2004; VELA et al., 2003).

Este gênero abriga patógenos clássicos como *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e uma grande variedade de micro-organismos oportunistas, os quais estão envolvidos com infecções urinárias, bacteremia, endocardite, meningite, entre outras. Dentre estes oportunistas, destacam-se *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium*

glucuronolyticum, *Corynebacterium macginleyi* (DOBLER; BRAVENY, 2002; FERNÁNDEZ-NATAL et al., 2008; MARULL; CASARES, 2008; MANZELLA et al., 1995; MORRIS; GUILD 1991; MUNIAN et al., 1997; ORDÓÑEZ-PALAU et al., 2007; PRETE et al., 2008; WANG et al., 2001).

É preciso ressaltar que as infecções humanas causadas por estas corinebactérias vêm adquirindo grande importância em países industrializados e em desenvolvimento, uma vez que o número de casos relatados, por vezes fatais, em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes tem aumentado, assim como o isolamento de amostras multirresistentes às drogas comumente utilizadas na antibioticoterapia.

1.2.1 Patógenos potencialmente produtores de toxina diftérica - *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*

C. diphtheriae é o patógeno humano mais bem caracterizado deste gênero. É o principal agente etiológico da difteria clássica, uma doença infecciosa aguda imunoprevenível que afeta principalmente o trato respiratório e é potencialmente fatal devido à ação de uma exotoxina, a toxina diftérica (TD), a qual apresenta tropismo para o miocárdio, sistema nervoso central, rins e supra-renais (GALAZKA et al., 1995).

Apesar da existência de um programa de vacinação contra difteria desde a década de 40, esta doença que foi uma das mais prevalentes e temidas antes da Era da vacinação, ainda hoje representa um grave problema de Saúde Pública em todo o mundo. Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), permanecem ocorrendo surtos em diversos países em desenvolvimento e industrializados, além da difteria permanecer endêmica em diversas partes do mundo, particularmente em países em desenvolvimento, como Índia, Vietnã, Caribe e países da América. No Brasil, a difteria incide de forma endêmica, com o aparecimento de surtos epidêmicos nas diversas regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2014).

Além da preocupação com a difteria clássica, a comunidade científica e os profissionais de saúde têm voltado sua atenção para outros processos infecciosos causados principalmente por amostras não produtoras de TD. Estas infecções variam de lesões cutâneas e faringites a doenças invasivas, como endocardite (HIRATA Jr. et al., 2008; MENON, SENTHILKUMAR; PACHAIYAPPAN, 2010; MUTTAIYAH et al., 2011), bacteremia (MATTOS-GUARALDI et al., 2001a), artrite séptica (FARAJ et al., 2003), osteomielite (POILANE et al., 1995), abscessos esplênicos (ALEXANDER, 1984) e infecção relacionada ao uso de cateter de nefrostomia

(GOMES et al., 2009). É preciso ressaltar que estes quadros já foram descritos tanto em pacientes imunizados como em não imunizados.

Outras espécies do gênero *Corynebacterium* também são capazes de produzir a TD e têm sido alvo de estudos em diversos países: *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*. Classicamente, a espécie *C. ulcerans* tem sido descrita como agente etiológico de quadros diversos de infecções em animais, principalmente de mastites em gado bovino. Os primeiros casos de infecções em humanos foram normalmente associados ao consumo de leite não fervido/pasteurizado e derivados. A partir de meados da década de 1980, o número de casos de difteria de natureza zoonótica causada pelo *C. ulcerans* aumentou em diferentes países. Na Inglaterra, por exemplo, o número de casos de difteria por esta espécie superou o relacionado com o agente etiológico clássico, *C. diphtheriae*. De modo geral, estas infecções acometem pacientes parcialmente imunizados para difteria (BONMARIN et al, 2009; DIAS et al., 2011; TEJEDOR et al. 2000; TIWARI et al., 2008; VAN DAM et al., 2003; WAGNER et al., 2010).

C. pseudotuberculosis é agente causador de diversas doenças de cunho veterinário, dentre as quais a linfadenite caseosa (LC) e a linfagite ulcerativa, tendo por isso grande interesse veterinário e econômico (KURIA et al., 2001). Em humanos, *C. pseudotuberculosis* pode causar infecção cujos sinais e sintomas são semelhantes ao da LC, e o modo de transmissão mais aceito é por contato com animais doentes ou ingestão de carne ou leite contaminados (TROST et al., 2010). Com base na expressão da enzima nitrato redutase, que permite a conversão de nitrato a nitrito em provas bioquímicas, esta espécie pode ser dividida em dois biovars, denominados *ovis* e *equi*. O biovar *equi* (sorotipo II) é capaz de reduzir o nitrato, enquanto o biovar *ovis* (sorotipo I) não apresenta esta habilidade (BATEY, 1986; BELCHIOR et al., 2006; COSTA, 2002; LEARDINI et al., 2002). Cepas isoladas de ovinos e caprinos pertencem geralmente o biovar *ovis*, enquanto as de cavalos e búfalo pertencem ao biovar *equi* e as de gado são variáveis (DORELLA et al., 2006; TEJEDOR-JUNCO et al., 2008; WAGNER et al., 2011).

1.2.2 Patógenos não produtores de toxina diftérica

Corynebacterium urealyticum, também conhecido como *Corynebacterium* grupo D2 faz parte da microbiota humana, podendo ser encontrado em 12% da população saudável e em 30% dos pacientes hospitalizados, principalmente naqueles que estejam em uso de antibióticos de amplo espectro. Esta espécie tem sido estudada por décadas e atualmente é

reconhecida como agente causador da cistite e pielonefrite (GUIMARÃES et al., 2013; LIETEN et al., 2011; PRETE et al., 2008; SORIANO; TAUCH, 2008; SORIANO et al., 2009). Esta espécie compreende micro-organismos fastidiosos e que apresentam forte atividade ureásica. Esta atividade desempenha papel importante na patogênese da infecção urinária por facilitar a formação das pedras de estruvita, estruturas ricas em fosfato de amônio magnésiano. É preciso ressaltar que o difícil crescimento das amostras, aliado ao alto grau de resistência aos antimicrobianos que elas apresentam, dificulta o diagnóstico laboratorial e compromete a eficácia do tratamento clínico (GUIMARÃES et al., 2013; JOHNSON; STROPE, 2012; SORIANO; TAUCH, 2008; SORIANO et al., 2009). Além da atividade ureásica, outros fatores de virulência relatados incluem a capacidade de aderir e formar biofilme em diferentes superfícies, tanto bióticas quanto abióticas (SORIANO et al., 2009).

Corynebacterium glucuronolyticum foi primeiramente descrito em 1995 por Funke e colaboradores em um paciente com infecção do trato genitourinário. É geralmente encontrado no trato urogenital de humanos e de suínos (DEVRIESE et al., 2000). Atualmente, *C. glucuronolyticum* é um dos agentes mais comuns, juntamente com os *Staphylococcus spp.* coagulase-negativa e *E.coli*, capaz de causar a prostatite (NOVO-VELEIRO et al., 2013). Também existem relatos de uretrites e infecções em outras regiões do trato urinário baixo (GALAN-SANCHEZ et al., 2011; ROUSSEAU et al., 1999).

Corynebacterium jeikeium, anteriormente conhecida como CDC do grupo JK, é um micro-organismo comumente encontrado colonizando regiões axilares, retais e inguinais em pacientes hospitalizados. É também relatado como causador de diversas infecções em pacientes imunocomprometidos, como bacteremias, infecções pulmonares (FUNKE et al., 1997; JOHNSON et al., 1992; ROZDZINSKI et al., 1991; SATO; UCHIYAMA, 2012), endocardite (BELMARES et al., 2007; MOOKADAM et al., 2006) e infecções de partes moles (OLENDER; LETOWSKA, 2010), sobretudo em pacientes submetidos a procedimentos invasivos, tais como cateterismo profundo e implantação de dispositivos cardiovasculares (BECHARA et al., 2011; CHAO et al., 2013; SORIANO et al., 1988). É preciso ressaltar que *C. jeikeium* é uma das espécies mais resistentes do gênero *Corynebacterium* aos agentes antimicrobianos, sendo susceptíveis apenas aos glicopeptídeos. Por este motivo, a vancomicina é muitas vezes é o antimicrobiano utilizado em infecções por *C. jeikeium* (BECHARA, 2011; RIEGEL et al., 1996; WEISS et al., 1996).

A espécie *Corynebacterium afermentans* foi descrita pela primeira vez em 1981 pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, em português, Centro de Controle e Prevenção de Doenças) como *Corynebacterium* do grupo *absolute nonfermenter* 1 (ANF-1,

em português, Não Fermentadores Absolutos 1) e posteriormente renomeada *Corynebacterium afermentans* (RIEGEL et al., 1993), esta espécie tem sido isolada de hemoculturas (BABEY; KAMBAL, 2004; BALCI et al., 2002; KUMARI et al., 1997), abscessos cerebral, pulmonar e hepático (DYKHUIZEN, 1995; MINKIN; SHAPIRO, 2004) e urinoculturas (CAMELLO et al., 2003). Algumas amostras isoladas desses estudos revelaram multirresistência (CAMELLO et al., 2003).

O complexo XSMA engloba quatro espécies de importância clínica, comumente encontradas em ambientes nosocomiais e isoladas de diversos sítios anatômicos: *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium amycolatum*. A diferenciação entre as espécies exige o emprego de técnicas moleculares e testes fenotípicos adicionais não utilizados rotineiramente nos laboratórios clínicos, uma vez que os micro-organismos apresentam características fenotípicas pouco distintas (RENAUD et al., 1998; WAUTERS et al., 1998).

C. amycolatum é uma das espécies do gênero *Corynebacterium* mais isoladas de espécimes clínicos (CAMELLO et al., 2003; FUNKE et al., 1996; MARTINS et al., 2009; RIEGEL et al., 1996). É também frequentemente resistente aos antimicrobianos, característica que contribui para a sua distinção entre as outras espécies no diagnóstico microbiológico (ESTEBAN et al., 1999; OTEO et al., 2001). Amostras de *C. amycolatum* já foram isoladas de pacientes com quadros de infecções invasivas diversas (ESTEBAN et al., 1999), dentre elas bacteremia (OTEO et al., 2001; YOON et al., 2011), artrite séptica (CLARKE et al., 1999), sepse (MIGUEL et al., 1999; MIGUEL-MARTINEZ et al., 1996) e endocardite (DALAL et al., 2008; KNOX; HOLMES, 2002), principalmente em indivíduos imunossuprimidos.

C. minutissimum, agente etiológico do eritrasma, faz também parte da microbiota residente da pele e mucosas humanas. Desde a sua descrição em 1961, é raramente associado com infecções extracutâneas. Contudo relatos de endocardite (APERIS; MOYSSAKIS, 2007; HERSCHORN; BRUCKER, 1985), bacteremia (DALAL; LIKHI, 2008; GUARDERAS et al. 1986), meningite (DALAL; LIKHI, 2008), pielonefrite (AHMAD; AHMAD, 2005), infecções relacionadas a cateter (CAVENDISH et al., 1994; RUPP et al., 1998) e peritonite (FERNÁNDEZ GIRÓN et al. 1998) podem ser encontrados na literatura.

C. striatum é um micro-organismo potencialmente patogênico para humanos, frequentemente associado a surto nosocomiais (BAIO et al., 2013). Infecções por *C. striatum* já foram descritas tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em indivíduos imunocompetentes (SUPPERT et al., 2009). Dentre estas infecções, destacam-se: ITU (LÓPEZ et al., 2009), infecções pulmonares (RENOM et al., 2007; WONG et al., 2010),

meningite (WEISS et al., 1996), endocardite (FERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 2013; OLIVA et al., 2010), osteomielite (FERNÁNDEZ-AYALA et al., 2001) e artrite séptica (SCHOLLE, 2007). É importante ressaltar que muitos dos isolados nestas infecções apresentavam alta taxa de resistência aos antimicrobianos (OTSUKA et al., 2006).

C. xerosis faz parte da microbiota residente do saco conjuntival (PORSCHEN et al., 1977). Seus relatos de infecção em humanos são poucos e a maioria dos isolados quando previamente identificados por *C. xerosis* são subsequentemente reconhecidos como *C. amycolatum* devido à sua proximidade filogenética (FUNKE et al., 1996; WAUTERS et al., 1998). Contudo, esta espécie já foi relacionada à infecção de sítio cirúrgico (MARTI et al., 2008), endocardite (PESSANHA et al., 2003), sepse (CATTANI et al., 2000) e abscessocerebral (WOOSTER et al., 1999).

1.3 Fatores de virulência de corinebactérias

Os principais estudos que investigam fatores de virulência de corinebactérias foram descritos para *C. diphtheriae*. Nesta espécie, o mais conhecido mecanismo de virulência é a TD, um polipeptídeo de aproximadamente 58 kDa com 535 resíduos de aminoácidos. O efeito citotóxico da TD deve-se à inibição da síntese protéica através da ribosilação do fator de alongamento EF-2 (HOLMES, 2000). É preciso ressaltar que a TD pode ser produzida apenas por amostras que possuem o gene codificador (gene *tox*), carregado por fagos lisogênicos (corinefagos) do tipo β ou β -relacionados, integrado ao seu cromossomo. O gene *tox* tem sua transcrição negativamente regulada por íons ferro e por uma proteína repressora, conhecida como DtxR (“Diphtheria Toxin Repressor”), presente em todas as amostras de *C. diphtheriae* (DE ZOYSA et al., 2005).

A ocorrência de infecções causadas pelo *C. diphtheriae* em indivíduos imunizados e o crescente número de infecções invasivas causadas por amostras atoxinogênicas sugerem que outros fatores além da TD são importantes para o aparecimento e manutenção do processo infeccioso. Neste sentido, estudos desenvolvidos nas últimas décadas têm demonstrado que as amostras, independente da produção de toxina, podem aderir com intensidades variadas a diferentes substratos, incluindo células humanas e dispositivos médicos. Várias proteínas fimbriais e não-fimbriais já foram descritas como possíveis participantes destes processos. Além delas, carboidratos de superfície, hidrofobinas e trans-sialidases também parecem estar envolvidas (ANTUNES et al., 2015; BERTUCCINI et al., 2004; COLOMBO et al., 2001;

GOMES et al., 2009; HIRATA JR et al., 2004; MATTOS-GUARALDI et al., 2000; PEIXOTO et al., 2014).

A presença de fímbrias na superfície do bacilo diftérico foi relatada pela primeira vez por Yanagawa e Honda em 1976, quando foi sugerida a sua participação na aderência a eritrócitos de carneiro (hemaglutinação). Desde então, muitos estudos buscaram a sua caracterização estrutural e funcional. Estes revelaram que *C. diphtheriae* pode apresentar três estruturas fimbriais distintas, identificadas com Spa (“sortase-mediated pilus assembly”): pilus SpaA, pilus SpaD e pilus SpaH, sendo cada pilus formado por três subunidades menores: pilus SpaA (SpaABC), pilus SpaD (SpaDEF), pilus SpaH (SpaGHI). Ainda segundo eles, estas estruturas são polimerizadas e conectadas à superfície celular com a participação de diferentes sortases (BROADWAY et al., 2013; GASPAR; TON-THAT, 2006; MANDILIK et al., 2007; 2008; TON-THAT; SCHNEEWIND, 2003).

Análises moleculares mostraram que os genes codificadores das pilinas e das sortases estão localizados em ilhas de patogenicidade, estando parcial ou completamente ausentes em algumas cepas (IWAKI et al., 2010; TROST et al., 2012). O pilus SpaA mostrou-se o mais frequente entre as amostras estudadas e, por causa disto, tem sido o principal alvo de estudos sobre a participação das pilinas na virulência de *C. diphtheriae*. Até o momento, já foi descrito o seu envolvimento na aderência às células epiteliais da faringe e no processo patogênico desencadeado no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, utilizado como modelo experimental *in vivo* para estudos de virulência (BROADWAY et al., 2013; MANDILIK et al., 2007). Zasada e colaboradores (2012) também sugeriram que a expressão destas estruturas é indispensável para a ocorrência de infecções invasivas por amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae*.

Dentre as proteínas de natureza não-fimbrial, destacam-se as proteínas DIP 1281 (OTT et al., 2010) e DIP 0733 (SABBADINI et al., 2012). A proteína DIP 1281, anotada como invasina, tem sido estudada no processo de interação com células de linhagem epitelial de faringe. Entretanto, os resultados obtidos até o momento sugerem que ela esteja envolvida com a organização geral da superfície do bacilo diftérico (OTT et al., 2010). A proteína DIP0733, inicialmente descrita como proteína de superfície não-fimbrial 67-72p, participa na aderência a hemácias humanas (COLOMBO et al., 2001) e a células da linhagem de carcinoma de laringe humana HEP-2 (HIRATA et al., 2004). Além disso, Sabbadini e colaboradores (2012) demonstraram seu efeito na internalização e indução da apoptose em células HEP-2. Recentemente, Antunes e colaboradores (2015) relataram o papel desta proteína na ligação ao colágeno, fibronectina e fibrinogênio (Fg).

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

Nas últimas décadas também foi investigada a participação de carboidratos de superfície e proteínas lectínicas nas interações de *C. diphtheriae* com células do hospedeiro. Estudos realizados por Mattos-Guaraldi e colaboradores (1999; 2000) revelaram que a superfície do bacilo diftérico apresenta diferentes moléculas contendo resíduos de ácido siálico, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, galactose e manose com afinidade para lectina. Apesar do papel dos carboidratos de superfície na virulência do bacilo diftérico não ter sido bem caracterizado, os resultados obtidos sugerem que eles promovem alterações na hidrofobicidade e na carga bacteriana, modulando a aderência a substratos inertes e a células humanas, além de contribuir para a evasão do sistema imune.

É sabido que a presença de ácido siálico na superfície bacteriana deve-se às atividades realizadas pelas sialidases, também designadas neuraminidases. As sialidases são glicosil hidrolases que catalisam a remoção de resíduos de ácido siálico terminais de glicoconjugados presentes na superfície das células do hospedeiro. Através de suas atividades de *trans*-sialidase, as sialidases permitem também a aquisição do ácido siálico, permitindo ao micro-organismo expo-lo na sua superfície externa. Além disso, elas ainda podem funcionar diretamente como adesinas. Recentemente, uma provável exosialidase, NanH (DIP 0543), foi identificada em *C. diphtheriae* e revelou possuir uma atividade de *trans*-sialidase, mas seu papel na exposição do ácido siálico não ficou clara (BURKOVSKI, 2013; KIM et al., 2010; MATTOS-GUARALDI et al., 1998).

Além de aderir a superfícies inertes, os micro-organismos podem formar estruturas altamente complexas, os biofilmes, os quais possuem importância clínica em virtude do seu papel em muitas doenças infecciosas, incluindo endocardite, periodontite e otite média, e na contaminação de dispositivos hospitalares, sobretudo devido à sua alta resistência a agentes antimicrobianos (COSTERTON et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; SHARMA;YADAV, 2008). A habilidade do bacilo diftérico de formar biofilme foi inicialmente descrita por Gomes e colaboradores (2009) a partir do isolamento de uma amostra em sítio de inserção de cateter de nefrostomia. Nesse trabalho, foi verificada a

capacidade da cepa de formar biofilme nas superfícies do vidro, poliestireno e em cateter de poliuretano.

Além da capacidade de aderir aos tecidos do hospedeiro, já foi demonstrado que o bacilo diftérico é também capaz de penetrar e sobreviver no compartimento intracelular de células respiratórias humanas HEp-2, indicando que este pode ser um dos fatores que favorecem a manutenção do patógeno nas vias aéreas superiores e inferiores, de modo a permitir a permanência do estado de portador após antibioticoterapia, soroterapia e cura da difteria (HIRATA JR et al., 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que amostras de *C. diphtheriae*, independentemente da produção de toxina, podem ser fagocitadas por macrófagos humanos (linhagem U-937) na ausência de opsoninas e permanecem viáveis no compartimento intracelular. A sobrevivência intracelular dentro de macrófagos humanos pode contribuir, assim, para a disseminação bacteriana por via endovascular, além de conferir proteção contra atividades microbidas mais eficientes de outras células de defesa e contra a ação bactericida de agentes antimicrobianos (SANTOS et al., 2010).

O aumento na frequência e gravidade das infecções humanas associadas a *C. ulcerans*, tem feito desta espécie o objeto de pesquisa em alguns estudos sobre virulência bacteriana. Além da capacidade de produção de TD, *C. ulcerans* é capaz de produzir uma outra exotoxina, a fosfolipase D (PLD), cuja atividade esfingomielinásica aumenta a permeabilidade vascular e, assim, promove a disseminação tecidual do micro-organismo no hospedeiro (BERGIN et al., 2000; BONMARIN et al., 2009; MAY, 1972;). Ademais, esta exotoxina é capaz de reduzir a viabilidade de neutrófilos e macrófagos (SCHMIEL; MILLER 1999).

Análises moleculares recentes permitiram detectar genes de potenciais fatores de virulência, como catalase, desoxirribonuclease (DNAse), neuraminidase (NanH), endoglicosidade (EndoE) e proteases, além da adesina fimbrial do tipo SpaD (DEF) (TROST et al., 2011). Estudo recente permitiu também observar que, assim como *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* é capaz de se ligar à fibronectina, colágeno e fibrinogênio (SIMPSON-LOUREDO et al., 2013).

À semelhança do observado em *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* é capaz de produzir a TD e a PLD, sendo esta última considerada o principal fator de virulência desta espécie. Além da toxigenicidade, amostras de *C. pseudotuberculosis* apresentam a habilidade de resistir a diferentes agentes estressores, o que lhes permite sobreviver no ambiente por meses antes de infectar o hospedeiro animal, e no interior de células eucarióticas, sobretudo de linhagem fagocítica, nas quais também são capazes de se multiplicar (BAIRD;

FONTAINE, 2007; STEFAŃSKA et al., 2010). Pesquisas recentes têm relacionado a estes processos alguns reguladores transcricionais, como fatores sigma (δ) alternativos da RNA polimerase, e os lipídios tóxicos de parede celular (MORAES et al., 2012; PACHECO et al., 2012). Dentre os fatores δ , o δ^E tem sido o mais estudado. Os resultados indicam que este regulador é importante para a resistência da espécie ao estresse oxidativo induzido por óxido nítrico e peróxido, o que é determinante para a sobrevivência no interior de fagócitos (PACHECO et al., 2012). Os lipídeos associados à parede celular de *C. pseudotuberculosis* são semelhantes ao ácido micólico de *Mycobacterium tuberculosis* e foram descritos há muito tempo como importantes fatores para a patogênese da doença (HARD, 1972). Esta camada atua conferindo proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos além de conferir baixa permeabilidade ao envelope celular, o que consiste uma barreira natural contra antibióticos (PORTEVIN et al., 2004).

Outro importante mecanismo de virulência desta espécie é o sistema de transporte ABCD de ferro (SANTANA 2014). Em *C. pseudotuberculosis*, este sistema envolve primariamente o operon *fagABC*, localizado downstream do gene *pld*, e o gene *fagD* (BILLINGTON et al., 2002; DORELLA et al., 2006), contudo operon *ciuABCD* também tem se mostrado importante para esta espécie (CARSON et al., 1999; RUIZ et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O potencial patogênico de micro-organismos do gênero *Corynebacterium* com exceção do agente etiológico da difteria clássica, *C. diphtheriae* permanece subestimado. Entretanto, nas últimas décadas, ocorreu um aumento considerável de relatos de casos de infecções humanas relacionadas com algumas espécies de corinebactérias potencialmente não produtoras de TD em infecções humanas, particularmente devido ao fato que profissionais de saúde diretamente envolvidos no atendimento dos pacientes na identificação clínica e laboratorial encontram-se mais conscientes quanto ao potencial patogênico desse grupo de micro-organismos.

Atualmente, entre os membros do gênero *Corynebacterium*, somente *C. urealyticum* é descrito como agente causador de ITU. Contudo, tem sido observado um crescente aumento no isolamento de outras espécies deste gênero em urinoculturas, sobretudo naquelas provenientes de pacientes imunocomprometidos, de indivíduos com longo tempo de internação ou de transplantados. Nota-se também que algumas destas espécies foram originalmente descritas como agentes de infecção em outros sítios que não o sistema urinário (AUDARD et al., 2003; CAMELLO et al., 2009; CHOE et al., 2012; DIAS et al., 2010; FERRER et al., 2001; FUNKE et al., 1998; HERTIG et al., 2000; LÓPEZ et al., 2009; VEDEL et al., 2006; VERDAGUER et al., 2008; VILLANUEVA et al., 2002; PRETE et al., 2008).

Com base no exposto, fazem-se necessários trabalhos que caracterizem os isolados de *Corynebacterium* spp de urinocultura, a fim de se identificar a predominância das espécies envolvidas nas ITU. Além disso, a pesquisa pelos mecanismos de patogenicidade destas amostras e o conhecimento dos seus perfis de sensibilidade aos antimicrobianos tornam-se imprescindíveis para planejar as ações terapêuticas das infecções desencadeadas por estes micro-organismos.

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar aspectos microbiológicos e epidemiológicos de espécies de *Corynebacterium* spp. isoladas de urina de pacientes com quadros de ITU atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE/UERJ), durante o período de 2011 a 2013. Nesse sentido, foi

também documentado, pela primeira vez, o isolamento de *C. mycetoides* de urinocultura e realizadas investigações relativas a eficácia de diferentes métodos laboratoriais de identificação e ao potencial de virulência dessa espécie.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificação fenotípica por métodos convencionais de amostras de corinebactérias isoladas de urina de pacientes atendidos no HUPE/UERJ;
- b) Análise dos dados clínico-epidemiológicos de quadros de infecção por corinebactérias no trato urinário relativos ao período 2011-2013;
- c) Determinação dos perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão em disco;
- d) Análise da morfologia colonial e celular e do perfil fenotípico de *C. mycetoides*;
- e) Análise da eficácia de diferentes métodos semi-automatizados de diagnóstico microbiológico na identificação de *C. mycetoides*;
- f) Identificação de *C. mycetoides* pelas técnicas moleculares: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight (MALDI-TOF, em português, Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Vôo) e sequenciamento dos genes conservados 16S rRNA e *rpoB*;
- g) Avaliação do potencial de virulência de *C. mycetoides* utilizando o modelo experimental *in vivo* com o nematódeo *C. elegans*;
- h) Investigação da capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas diversas;
- i) Pesquisa da capacidade de interação e de sobrevivência intracitoplasmática de *C. mycetoides* em células epiteliais renais (linhagem VERO, oriundas de macaco verde africano).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Origem e cultivo das cepas e levantamento epidemiológico dos casos de ITU relacionados a corinebactérias em pacientes atendidos pelo HUPE/UERJ (2011-2013)

As amostras de BGPI isoladas de urinoculturas durante o período de janeiro de 2011 e janeiro de 2013 no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) do HUPE e enviadas ao Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM/UERJ), Centro Colaborador para Difteria da Coordenadoria Geral de Laboratórios da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (CGLAB/SVS/MS), para identificação das espécies de corinebactérias foram analisadas no presente estudo.

As urinoculturas foram realizadas inicialmente em *Cystine Lactose Eletrolyte Deficient* (CLED, em português, Agar de Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos) e incubados a 37°C durante 24-48h e considerados positivos nos casos de cultura-pura ($\geq 10^4$ UFC/ml) ou de crescimento de até dois tipos de colônias (10^5 UFC/ml). Nos casos de nefropatias, foram consideradas positivas as culturas puras ou mistas com crescimento $\geq 10^3$ UFC (FUNKE; BERNARD, 2011; MARTINS et al., 2009). As amostras estão mantidas estocadas em Skim-Milk acrescido de 1% de glicerol na bacterioteca do LDCIC.

O levantamento epidemiológico foi realizado com base nos dados destas urinoculturas. Os dados foram analisados com relação às seguintes variáveis: sexo, idade, setor, sub-setor, espécie encontrada, contagem de bactérias viáveis, co-infecção por outros patógenos e perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software estatístico Epi-Info v.3.5.1 (2008).

Uma vez que as amostras deste estudo foram provenientes da bacterioteca do LDCIC e as suas informações constam no banco de dados do laboratório, não foi necessária a submissão desta pesquisa ao comitê de ética.

Aspectos clinico-epidemiológicos de *Corynebacterium mycetoides* 2450

A amostra 2450 de BGPI, inicialmente identificada como *Corynebacterium* sp., foi isolada de urina de paciente do sexo feminino com 57 anos de idade, portador do vírus da hepatite C, fazendo uso contínuo de ciclosporina. A paciente, em acompanhamento pelo ambulatório da nefrologia do HUPE/UERJ, foi submetida a transplante renal em 1999 e

apresentava histórico de infecções urinárias recorrentes desde 2002 por diversos micro-organismos (*Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Corynebacterium afermentans* e outros bastonetes Gram-positivos não identificados isolados em culturas puras).

Identificação laboratorial das cepas de corinebactérias isoladas de urinoculturas

Após o isolamento primário em CLED, as amostras de BGPI recebidas no LDCIC foram cultivadas em meio *Columbia Agar Base* (CAB, em português, Base de Ágar Sangue) (CAB-Difco) adicionado de sangue de carneiro 5%, incubadas a 37°C por até 48h e avaliadas quanto à morfologia celular (coloração de Gram) e colonial (tamanho, cor, forma, elevação, superfície, densidade, consistência e hemólise). Posteriormente foram submetidas aos seguintes testes fenotípicos de acordo com metodologia previamente descrita (CAMELLO et al., 2003; FORMIGA; MATTOS-GUARALDI, 1993; FUNKE; BERNARD, 2011; JANDA, 1998; KONEMAN et al., 2010; PIMENTA et al., 2008): produção de catalase e porfirina, hidrólise de esculina, uréia e gelatina, redução de nitrato, produção das enzimas pirazinamidase (PYZ), fosfatase alcalina (PAL), desoxirribonuclease (DNAse) e metabolização (fermentação/oxidação) de carboidratos (glicose, maltose, sacarose, ribose, trealose, manose, manitol, frutose, arabinose, galactose e xilose, na concentração final de 1% em meio *Cystine Tryptic Agar* (CTA, em português: Ágar Cistina Trypticaseína) semi-sólido. Adicionalmente, foi realizada a pesquisa do fator CAMP em Ágar-Sangue de carneiro 5% utilizando amostra padrão produtora de beta-lisina de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos através do método de difusão em disco

Para determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados, foi preparada uma suspensão bacteriana em turvação correspondente à do tubo 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, a amostra foi semeada em meio Ágar Müller-Hinton com 5% de sangue de carneiro (Plast Labor[®], BR) visando à obtenção de uma camada confluenta de células bacterianas. À superfície da placa foram adsorvidos discos contendo os seguintes antimicrobianos: Penicilina G (10 U), Ampicilina (10 µg), Cefotaxima (30 µg), Gentamicina (10 µg), Sulfametoxazol/Trimetoprima (25 µg), Nitrofurantoina (300 µg), Eritromicina (15 µg), Imipenem (10 µg), Clindamicina (2 µg), Linezolid (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg),

Tetraciclina (30 µg), Rifampicina (5 µg), Vancomicina (30 µg). Após 24/48 horas de incubação a 37°C em aerobiose foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de acordo com os critérios preconizados pelo *Clinical and Laboratories Standarts Institute* (CLSI, em português, Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial) (CLSI, 2010) para outros microorganismos que não sejam *Haemophilus spp.* e *Neisseria gonorrhoeae*. Para a leitura dos halos de penicilina G e ampicilina, foram utilizados os diâmetros estabelecidos para *Staphylococcus aureus* (JANDA, 1999; MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1995; PEREIRA et al., 2008;). As amostras que apresentaram níveis intermediários de resistência foram consideradas como resistentes. Amostras que não apresentavam susceptibilidade para pelo menos um antibiótico pertencentes a três ou mais categorias de antimicrobianos foram definidas como multidroga-resistente (MDR) (MAGIORAKOS et al. 2012).

Análise comparativa de métodos semi-automatizados de diagnóstico microbiológico

Para a amostra 2450 foi realizada a análise comparativa entre os resultados obtidos pelos sistemas comerciais semi-automatizados API Coryne (BioMérieux Inc., FR), RapID™ CB Plus System (Oxoid Inc., UK) e BBL Crystal™ GP (Becton Dickinson and Company, US) realizados conforme as instruções dos fabricantes (BURKOVSKI, 2014).

As amostras clínicas foram avaliadas pelo método comercializado semi-automatizado API Coryne System 4.0 (BioMérieux Inc., FR), seguindo a plataforma de consulta API Web decoding system (www.apiweb.biomerieux.com), que inclui os seguintes testes: redução de nitrato, atividade pirazinamidásica, fosfatase alcalina, produção de urease, gelatinase e fermentação de carboidratos, dentre outros.

O Sistema RapID CB Plus System (Oxoid Inc., GB) é um sistema de identificação rápida, com leitura dos resultados proposta em 4 horas. Similar ao API Coryne System, ele também é composto por testes enzimáticos e de fermentação de carboidratos, sendo alguns desses testes: fermentação de glicose, sacarose, ribose, maltose, atividades enzimáticas para uréia e nitrato.

O BBL Crystal Gram Positive Identification (Becton Dickinson and Company, US), assim como os anteriores é um Sistema commercial que também contempla testes bioquímicos diversos semelhantes aos dois sistemas anteriores. Posteriormente a interpretação do teste, o biocódigo gerado a partir dos resultados de cada teste é lido com o BBL™ Crystal™ MIND Software, fornecido separadamente pelo fabricante.

Com exceção do sistema Rapid CB Plus, os demais sistemas são de incubação padrão de 24 horas. Todos os três requerem a temperatura de 37°C em aerobiose. Para a leitura dos resultados, somente o sistema Api Coryne utiliza uma solução não fornecida no kit, peróxido de hidrogênio.

Técnica de MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of Flight)

A caracterização molecular da amostra 2450 foi realizada pelo MALDI-TOF utilizando o método direto de análise previamente descrito (THEEL et al., 2012). Alíquota da amostra em cultura fresca foi inoculada com o auxílio de uma haste na placa de análise dentro espaço delimitado. Em seguida, foi adicionado 1µl de ácido fórmico 70% (Sigma-Aldrich Co, US) e a placa deixada em temperatura ambiente para secagem. Depois de seco, 1µl da matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) foi também adicionada e a placa deixada em temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos pelo aparelho em um modo positivo linear (Microflex, Bruker Daltonics, US). O padrão de teste bacteriano (BTS, Bruker, US) foi utilizado para calibração de instrumentos. Os espectros de massa foram analisados em um m/z gama de 2.000 a 20.000. A biblioteca de MALDI Biotyper versão 3.0 e software de versão 3.1 de MALDI Biotyper foram usados para identificação bacteriana.

Ensaio de sequenciamento de genes 16S rRNA and *rpoB*

A genotipagem da amostra 2450 foi realizada através de ensaios de sequenciamento de genes 16S rRNA and *rpoB* baseados em protocolos previamente estabelecidos por diversos autores. Para a análise do gene 16S rRNA foram utilizados os iniciadores PA/PH, 1831/1832 e 519R e 1242F e para o gene *rpoB* os iniciadores 2700 e 3130 apresentados na **Tabela 1**.

Extração do DNA total - A amostra foi cultivada em tubos contendo 3 ml de “Brain Heart Infusion” (BHI; Difco™ & BBL™, US) e incubados a 37°C por 24-48 horas. Alíquotas de 2 ml de cultura foram transferidas para um microtubo e centrifugados a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 500 µl de água ultrapura isenta de RNase e DNase estéril (Promega, US) e submetida a banho-maria fervente (100°C) por 10 min. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. Este material foi posteriormente descongelado e centrifugado a 14000 rpm por 10 s. O sobrenadante foi

transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C para posteriormente ser utilizado na reação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) (BAIO et al. 2013).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) - Para a amplificação dos genes 16S rRNA e *rpoB*, a PCR foi realizada em um volume final de 50 μl . As reações individuais foram compostas de água ultra pura isenta de DNase e RNase estéril, tampão de reação 1X, 3 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP (dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP] 10mM), 100 ng de cada iniciador (**Tabela 1**), 1,5 U da enzima *Taq* polimerase (Promega) e 5 μl do DNA obtido pela extração por choque térmico, como descrito anteriormente. As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e uma etapa final de extensão a 72°C por 7 min (BAIO et al. 2013; KHAMIS et al. 2005; WATTS et al. 2000).

Eletroforese em gel de agarose - Os géis de agarose foram preparados a 2% dissolvendo a agarose ultrapura (Invitrogen™, US) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (BioRad Labs, US). Foram aplicados 7 μl do produto da PCR e 1 μl de marcador de peso molecular (Invitrogen™) nos poços do gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 55 V por 60 min. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/ml) e observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com o equipamento ImageQuant 300™ (GE Healthcare Life Science, GB).

Purificação dos produtos de PCR - Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit PureLink PCR (Invitrogen™). A purificação foi realizada conforme as instruções do fabricante, com exceção da utilização do isopropanol, o qual foi substituído por etanol absoluto (Merck, BR). Para purificação dos produtos de PCR com bandas inespecíficas, foi empregado o sistema E-gel (Invitrogen™), utilizando o gele de agarose CloneWell 0,8%, seguindo as instruções do fabricante.

Sequenciamento e análise das sequências nucleotídicas - Os produtos purificados foram utilizados como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Applied Biosystems™, US) conforme as recomendações dos fabricantes. Posteriormente, os produtos desta reação foram precipitados com 80 μl de uma solução com 75% de isopropanol, centri-

fugados por 45 min a 4000 rpm a 21°C e o sobrenadante desprezado pela inversão cuidadosa da placa em papel de filtro. A placa foi invertida em cima de outro papel de filtro, centrifugada por 1 min a 900 rpm a 21°C. A placa foi levada ao termociclador para secagem a 75°C por 5 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 10 µl de formamida, centrifugados por 1 min a 900 rpm a 21°C, incubados por 5 min a 95°C e resfriados imediatamente em banho de gelo. Após a corrida no sequenciador (ABI PRISM 3100 Applied Biosystems DNA Sequencer), as sequências nucleotídicas foram analisadas e editadas utilizando o programa SeqMan versão 7.0 (DNASTAR *Lasergene*) e comparadas às aquelas depositadas no banco de sequências GeneBank e Ribosomal Database Project II (RDP-II)

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento dos genes conservados 16S rRNA e *rpoB* para a identificação da amostra 2450 isolada de urinocultura de paciente submetido a transplante renal atendido no HUPE/UERJ

Gene	Fragmento (pb)	Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Referência
16SrRNA	1500	PA ^{a,s}	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Watts et al., 2000
		PH ^{a,s}	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
		519R ^s 1242F ^s	GTATTACCGCGGCGGCTG CACACGTGCTACAATGG	Jonhson, 1994
		1831 ^s 1832 ^s	GAGGAACACCGATGGCGAAGG GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	Watts et al., 2000
		<i>rpoB</i>	400	2700F ^{a,s} 3130R ^{a,s}

a, amplificação; s, sequenciamento.

Investigação do potencial de virulência bacteriana utilizando o modelo experimental com nematódeo *C. elegans*

A patogenicidade da amostra 2450 foi investigada utilizando o modelo experimental *in vivo* com o nematódeo *C. elegans* N2 por meio de 3 diferentes ensaios. Para todos, os nematódeos foram mantidos em placas contendo meio de crescimento para nematódeos (NGM), utilizando a cepa *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento, por aproximadamente 4 dias a 20 °C. Para o ensaio de infecção, através do qual é verificada a letalidade da amostra, placas de NGM foram preparadas com 20 µl de suspensão bacteriana a partir de uma cultura de 24 h em Trypticase Soy Broth (TSB, em português, Caldo Tripticaseína de Soja; Difco™ & BBL™, US) sob agitação. Após 24-48h, 20 vermes em

estágio larval L4 foram transferidos para placas contendo as amostras testes e observados diariamente durante 5 dias. Para cada amostra, foram realizadas ao menos 3 placas. Os números de vermes mortos ou desaparecidos foram utilizados nas análises estatísticas (SANTOS et al. 2015). Paralelamente, foi verificada a capacidade da amostra de induzir o efeito *bagging*, isto é, a eclosão dos ovos no interior de vermes adultos mortos.

Adicionalmente, a amostra foi testada quanto à indução do *star* quando é observado em meio líquido um aglomerado de nematódeos presos pelas próprias caudas. Para tanto, foi realizada a lavagem de uma placa de Petri contendo os nematódeos com 3ml de tampão M9. Após 30 segundos de homogeneização contínua da placa, todo o conteúdo foi retirado e dividido em tubos de 1,5 ml. Em seguida, o conteúdo da lavagem foi centrifugado 3 vezes por 30 segundos a 3000 rpm. O sobrenadante foi retirado e distribuído em alíquotas de 100 µl nos poços de placas de 24 orifícios contendo previamente 500 µl de tampão M9. Posteriormente, foram adicionados aos poços os seguintes volumes da suspensão bacteriana em concentração equivalente à densidade óptica de 0.2 ($\lambda=580$ nm): 50 µl, 100 µl, 150 µl e 200 µl. Poços contendo apenas tampão M9 e outros contendo a mesma solução e meio TSB foram utilizados como controle do experimento. Por fim, a placa foi incubada a 20°C por 5 dias (ANTUNES et al. 2016).

Avaliação da capacidade de formação de biofilme bacteriano em substratos abióticos diversos (vidro, poliestireno e catéteres de poliuretano, silicone e látex)

Ensaio de produção de biofilme em superfície hidrofílica e de carga positiva (vidro) - Tubos de vidro 13x100mm contendo 3ml de TSB foram utilizados no estudo de aderência ao vidro, a qual é observada através da deposição de uma camada bacteriana na face interna dos tubos. Para tal, a cepa 2450 foi suspensa neste meio em concentração correspondente a 10^7 UFC/ml e incubada por 48h a 37°C. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado sem agitação e uma nova partida de meio foi acrescentada. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e o experimento foi realizado em triplicata. Após a última incubação, os meios foram removidos, os tubos lavados por 3 vezes com solução salina tamponada fosfatada (PBS; 0,01M; pH 7,2) e corados com cristal violeta 2%. A produção de biofilme foi classificada de acordo com os seguintes padrões: I – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; e IV – ausência de bactérias aderidas (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; MOREIRA et al., 2003).

Ensaio de produção de biofilme em superfície hidrofóbica e de carga negativa (poliestireno)

- A produção de biofilme da amostra 2450 foi avaliada nesta superfície através de microtécnica previamente descrita por Stepanovic (2000) e por Gomes e colaboradores (2009). Resumidamente, 200 µl da suspensão bacteriana (10^7 bactérias/ml) em meio TSB foram inoculados em microplacas de 96 poços de fundo reto e incubados por 48h a 37°C. Ao término da incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (0,01M; pH 7,2) e posteriormente, 200µL de metanol PA foram adicionados aos poços por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi retirado e a placa deixada em temperatura ambiente para secagem. Duzentos microlitros de solução cristal violeta a 2% foram adicionados em cada poço e, após 5 minutos, a placa foi lavada exaustivamente com água destilada. Cento e sessenta microlitros de ácido acético a 33% foram, então, adicionados aos poços para eluição do corante. O controle negativo continha apenas TSB estéril. A absorbância (DO) de cada poço foi aferida utilizando-se espectrofotômetro apropriado (leitor de ELISA; BioRad Labs, modelo 550), em comprimento de onda de 570nm. A amostra foi classificada em uma das quatro categorias com base na DO: não aderente – DO obtida menor ou igual a DO do controle negativo (DO_C); fracamente aderente – $DO_C < DO \leq (2 \times DO_C)$; moderadamente $(2 \times) DO_C < DO \leq (4 \times DO_C)$ e fortemente aderente – $DO > (4 \times DO_C)$.

Ensaio semi-quantitativo de viabilidade celular e de produção de biofilme na superfície de catéteres (poliuretano, silicone e látex)

- Para avaliar a habilidade da amostra 2450 produzir biofilme nestes substratos, fragmentos de 4 cm de cateter de cada tipo, poliuretano (Intra Special Catheters GmbH, DE), silicone (Biosani, BR) e látex (Coloplast do Brasil, BR), foram utilizados em ensaios semi-quantitativos, segundo protocolo descrito por Maki e colaboradores (1977). Os fragmentos de cateteres foram incubados por 48 h a 37 °C em tubos de ensaio 13x100 mm contendo 4 ml de suspensão bacteriana em TSB (concentração equivalente à DO 0.2 em 580 nm). Após esse período, houve a troca do meio de cultura. Esta etapa foi repetida por mais três vezes. Findo este processo, o meio da última incubação foi retirado e o fragmento foi lavado com PBS por três vezes. Em seguida, o fragmento do cateter foi rolado em placa de Petri contendo meio Ágar Sangue de carneiro a 5%. A placa foi, então, incubada por 48 horas em estufa de aerobiose a 37 °C. A formação de biofilme foi considerada positiva quando visualizado um tapete bacteriano na área de rolamento do fragmento de cateter.

Ensaio de interação bacteriana com células de linhagem epitelial renal

Para a realização destes ensaios foram utilizadas células Vero (ATCC® CCL-81™; linhagem epitelial de rim de macaco verde africano) cultivadas em meio essencial de Eagle (MEM, Sigma-Aldrich Co, US) suplementado com antimicrobianos (50 mg/ml de gentamicina e 2,5 mg/ml de fungizona) e 5% de soro fetal bovino. A tripsinização dos tapetes celulares (solução de 0,2% tripsina e 0,02% EDTA em PBS, pH 7,4), foi realizada a cada 5-7 dias.

A capacidade de interação microbiana com estas células foi investigada através da contagem de bactérias viáveis durante a infecção de monocamadas celulares com 95% de confluência em placa de 96 poços. As monocamadas celulares foram infectadas com 10^6 UFC/ml e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por diferentes tempos de incubação: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h. Após o período de infecção, foram retiradas alíquotas do sobrenadante (100 µl), que foram diluídas e plaqueadas em meio *Trypticase Soy Agar* (TSA, em português, Ágar Tripticaseína de Soja; Difco™ & BBL™, US) para a determinação do número de UFC/ml. Os tapetes celulares foram então lavados três vezes com PBS (0,01 M; pH 7,4) e tratados com 500 µl de PBS contendo 0,1% Triton X-100 (BioRad Labs, US) para que as células fossem lisadas. Em seguida, alíquotas de diluições do lisado celular (100 µl) foram plaqueadas em meio contendo TSA para a determinação de células bacterianas viáveis associadas a monocamada. Paralelamente, para verificar o número de micro-organismos internalizados, as células foram tratadas com solução de gentamicina a 150 µg/ml e incubadas a 37 °C por mais 1 h. As células foram então lavadas com PBS e lisadas conforme descrito anteriormente. As contagens resultaram no número total de bactérias extracelulares, no número total de bactérias associadas ao tapete (intracelulares + extracelulares) e no total de bactérias ocupando localização intracelular (protegidas da ação do antimicrobiano) (HIRATA Jr et al., 2002).

4 RESULTADOS

4.1 Estudo dos casos de ITU relacionados com corinebactérias ocorridos em pacientes atendidos no HUPE/UERJ (2011-2013)

No presente estudo foram identificadas pelo LDCIC/UERJ 69 amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas processadas no LABAC-HUPE/UERJ, oriundas de pacientes que apresentavam quadro clínico de ITU atendidos em diferentes setores do HUPE, durante o período de janeiro de 2011 a janeiro de 2013. Os aspectos epidemiológicos e microbiológicos relativos aos casos de corinebactérias isoladas de urinoculturas estão apresentados nas **Tabelas 2 e 3** e nas **Figuras 1 e 2**. Os dados indicaram que os casos de ITU relacionados com corinebactérias foram observados em pacientes atendidos em diferentes setores do HUPE, sendo a maior parte de origem ambulatorial (58; 82,61%) (**Figura 1A**). A maioria dos pacientes (73,91%) foi atendida nas Unidades de Transplantes (n=35; 50,72%) e Nefrologia (n=16; 23,19%) (**Figura 1B**).

Conforme demonstrado nas **Tabelas 2 e 3**, o maior número de casos de corinebactérias isoladas de urinoculturas foi observado em pacientes do sexo feminino (n=49; 71,04%). Os dados também indicaram que as 69 amostras de corinebactérias foram isoladas de urinoculturas de pacientes entre 16 e 79 anos de idade. Os números de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas distribuídos pelas faixas etárias dos pacientes estão apresentados na **Figura 2**. O maior número de casos foi observado em pacientes adultos na faixa etária entre 41 a 60 anos (n=38; 55,07%). Não foram detectadas corinebactérias isoladas de urinoculturas de crianças menores de 13 anos de idade e idosos com mais de 80 anos de idade.

Conforme descrito na **Tabela 2**, 40,58% (n=28) das amostras de corinebactérias foram isoladas de urina em culturas puras. Os dados apresentados na **Tabela 3** demonstraram que dentre as 69 amostras identificadas como pertencentes ao gênero *Corynebacterium* a maioria (n=41; 59,42%) foi isolada em associação com uma (n=24; 58,54%) ou mais espécies bacterianas (n=15, 36,59%). Em seis oportunidades (2254a,b, 2257a,b, 2327a,b) foram isoladas duas espécies de corinebactérias de urinocultura de um mesmo paciente, quatro desses (2257a,b, 2327a,b) sem a presença de outros gêneros bacterianos. Na maioria dos casos de infecções mistas, ocorreu associação de uma espécie de corinebactéria com duas outras espécies bacterianas (n=22). Ocorreu apenas um caso de isolamento de corinebactéria em

associação com três outras espécies bacterianas (2254a,b) de urinocultura de paciente transplantado.

Das amostras isoladas de urinoculturas pertencentes ao gênero *Corynebacterium* neste estudo, 60 (86,96%) apresentaram contagem bacteriana igual ou superior a 10^3 UFC/ml, independente de estarem em associação ou em culturas puras. Os registros de contagem de viáveis obtidos nas urinoculturas de nove amostras (13,04%) não foram fornecidos ao LDCIC (**Tabelas 2 e 3**).

Os dados apresentados na **Tabela 3** demonstraram a presença de diversas espécies de micro-organismos isolados em associação com as corinebactérias nas urinoculturas pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* (n=20; 48,78%), *Streptococcus* (n=6; 14,63%), *Lactobacillus* (n=6; 14,63%) e *Escherichia* (n=6; 14,63%). Amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos foram mais frequentemente observados (n=17; 41,46%), incluindo 4 (23,53%) amostras multirresistentes aos agentes antimicrobianos.

Procedimentos laboratoriais utilizando testes fenotípicos clássicos indicaram o envolvimento de diferentes espécies de corinebactérias em quadros de ITU, incluindo *C. afermentans*, *C. propinquum*, *C. jeikeium*, *C. coyleae*, *C. urealyticum* e *C. glucuronolyticum*. Conforme ilustrado na **Figura 3**, as amostras pertencentes ao Complexo XSMA foram as mais isoladas das urinoculturas (n=40; 57,14%), tanto de culturas puras (n =19; 67,85%) quanto mistas (n=21; 51,22%).

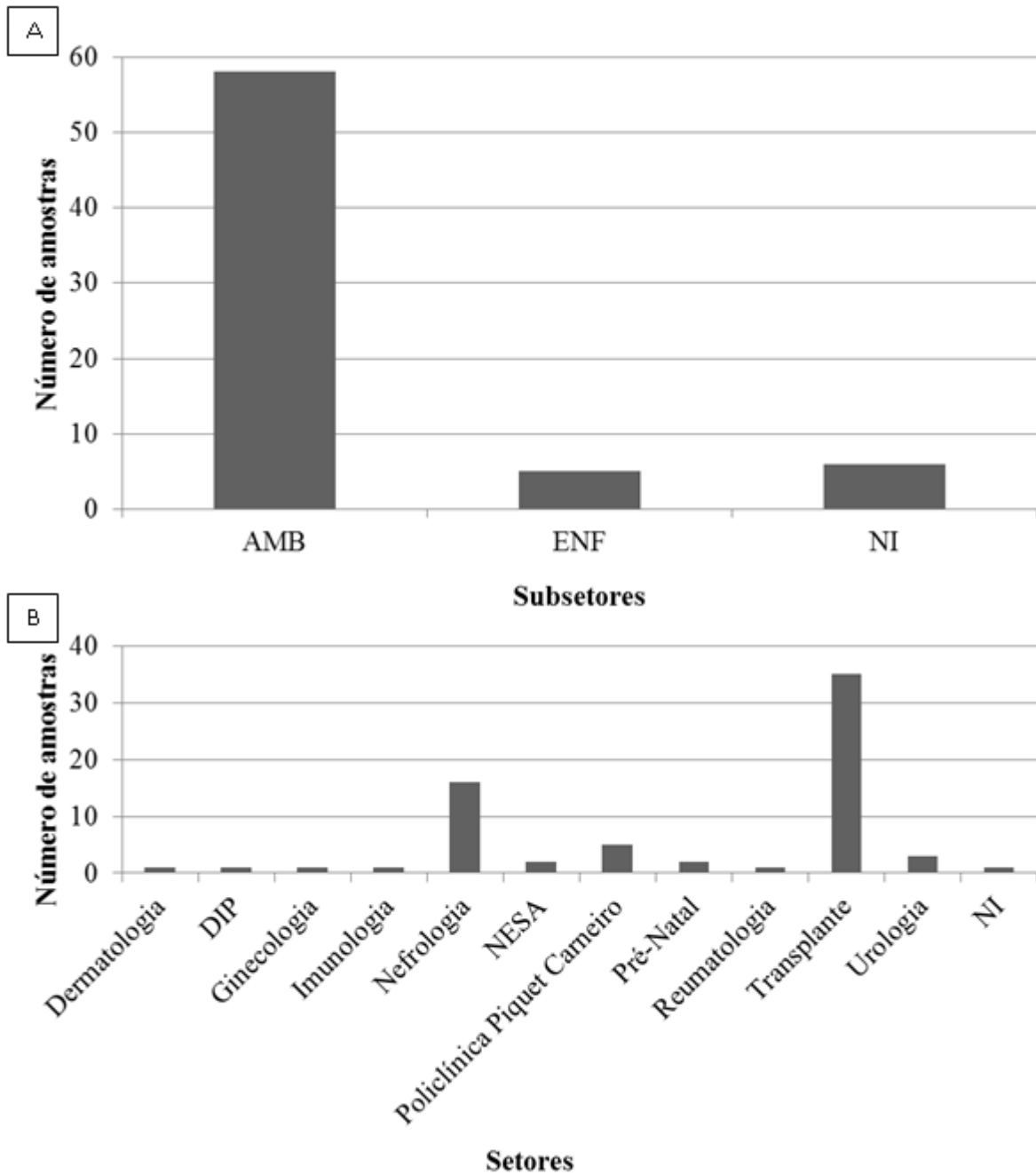
Na **Tabela 4** estão representados os perfis de susceptibilidade aos 14 agentes antimicrobianos observados pelo método de difusão em disco expressos pelas amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013). As amostras de corinebactérias apresentaram perfis variados de susceptibilidade aos antimicrobianos, sendo a maioria classificado como MDR. Amostras com perfis MDS foram observadas para micro-organismos do complexo XSMA, *C. afermentans*, *C. urealitycum*, *C. propinquum* e pertencentes ao grupo classificado como *Corynebacterium sp.* Entretanto, foi demonstrada 100% de sensibilidade para linezolida e vancomicina para todas as amostras de corinebactérias utilizadas no estudo. Não foi detectado 100% de resistência para nenhum dos antimicrobianos testados.

Os dados indicaram que nessa etapa do estudo, a maioria das amostras (n=55; 78,26%) isoladas das urinoculturas não pode ser identificada a nível de espécie pela metodologia aplicada e foram caracterizadas como pertencentes ao complexo XSMA (n=40; 57,97%), CDC Grupo G (n=1; 1,45%) e *Corynebacterium sp.* (n=14; 18,84%). Portanto,

confirmam a necessidade de avaliação adicional aplicando métodos moleculares para a identificação final dessas amostras. Ensaio utilizando as técnicas de MALDI-TOF e/ou o sequenciamento de genes conservados 16SrRNA e *rpoB* estão em andamento em nosso laboratório.

Nas **Tabelas 5A** e **5B** estão representados, respectivamente os perfis fenotípicos expressos pelas amostras de corinebactérias relacionadas e não relacionadas ao complexo XSMA isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013) que foram obtidos por testes bioquímicos convencionais. A amostra 2450 inicialmente identificada como *Corynebacterium* sp (**Tabela 5B**) foi utilizada nos estudos descritos a seguir relativos a eficácia de diferentes métodos laboratoriais de identificação e do potencial de virulência da espécie *C. mycetoides*.

Figura 1 – Número de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas de pacientes tratados em diferentes setores e sub-setores hospitalares (HUPE/UERJ) durante o período de janeiro de 2011 a janeiro de 2013



Legenda: DIP, Doenças Infecto-Parasitárias; NESA, Núcleo de Estudos da Saúde do Adolescente; AMB, ambulatório; ENF, enfermaria; NI, não informado.

Tabela 3 – Aspectos epidemiológicos e microbiológicos de 41 amostras de corinebactérias isoladas em associação com outros micro-organismos oriundas de urinoculturas de pacientes com quadro de infecção urinária atendidos em diversos setores do HUPE/UERJ (Jan 2011-Jan 2013)

Nº/Amostra/Ano	Dados dos pacientes	Origem dos casos no HUPE	Micro-organismos isolados nos plantios primários de amostras de urina		
	Sexo/Idade	Setor/Subsetor	Corinebactéria isolada	Contagem de bactérias viáveis (UFC/ml)	Micro-organismos associados
1/2206/2011	F/41	Nefrologia/AMB	<i>C. afermentans</i>	6,0 x 10 ³	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus spp.</i>
2/2209/2011	F/49	Transplante/AMB	Complexo XSMA	1,0 x 10 ⁵	<i>Streptococcus agalactiae</i> e BGNF
3/2213/2011	F/59	Transplante/AMB	Complexo XSMA	2,0 x 10 ³	BGNF
4/2214/2011	F/59	Transplante/AMB	<i>C. afermentans</i>	3,0 x 10 ³	BGNNF
5/2217/2011	F/NI	NI/NI	Complexo XSMA	8,0 x 10 ³	<i>Escherichia coli</i>
6/2224/2011	F/50	Transplante/AMB	Complexo XSMA	2,0 x 10 ³	<i>Staphylococcus spp.</i> e <i>S. agalactiae</i>
7/2226/2011	F/64	Nefrologia/AMB	Complexo XSMA	2,0 x 10 ⁴	<i>S. agalactiae</i>
8/2227/2011	F/NI	Transplante/AMB	Complexo XSMA	3,0 x 10 ³	SCN
9/2246/2011	F/58	Transplante/AMB	Complexo XSMA	1,0 x 10 ³	<i>Acinetobacter spp.</i> e SCN
10/2254a/2011	F/48	Transplante/AMB	<i>C. afermentans</i>	5,0 x 10 ³	SCN MDR, <i>E. coli</i> e Complexo XSMA
11/2254b/2011	F/48	Transplante/AMB	Complexo XSMA	3,0 x 10 ³	SCN MDR, <i>E. coli</i> e <i>C. afermentans</i>
12/2256/2011	M/62	Transplante/AMB	<i>C. propinquum</i>	1,0 x 10 ³	SCN
13/2257a/2011	F/57	Transplante/AMB	Complexo XSMA	NI	<i>C. propinquum</i>
14/2257b/2011	F/57	Transplante/AMB	<i>C. propinquum</i>	NI	Complexo XSMA
15/2258/2011	F/37	Transplante/AMB	<i>C. afermentans</i>	7,0 x 10 ³	<i>Staphylococcus spp.</i> MDR e <i>E. coli</i>
16/2265/2011	F/55	Transplante/AMB	Complexo XSMA	1,5 x 10 ⁴	SCN MDR
17/2266/2011	F/46	Transplante/AMB	<i>C. afermentans</i>	NI	BGNF e SCN
18/2267/2011	M/59	Transplante/AMB	Complexo XSMA	1,0 x 10 ³	SCN

19/2270/2011	F/54	Transplante/AMB	<i>C. afermentans</i>	5,0 x 10 ³	<i>Lactobacilus spp.</i> e SCN
20/2271/2011	F/NI	Nefrologia/AMB	Complexo XSMA	7,0 x 10 ³	SCN e <i>Lactobacilus spp.</i>
21/2274/2011	F/53	Transplante/AMB	Complexo XSMA	5,0 x 10 ³	<i>E. coli</i> e SCN
22/2278/2011	F/78	PPC/AMB	<i>Corynebacterium sp.</i>	1,1 x 10 ⁴	<i>E. coli</i> e SCN
23/2280/2011	F/59	Transplante/AMB	Complexo XSMA	NI	<i>Klebsiella pneumoniae</i> e SCN
24/2281/2011	F/48	Transplante/AMB	Complexo XSMA	3,0 x 10 ³	<i>K. pneumoniae</i> e SCN
25/2289/2011	F/49	Transplante/AMB	<i>Corynebacterium sp.</i>	3,5 x 10 ⁴	<i>Streptococcus spp.</i> α hemolítico
26/2293/2011	M/40	Transplante/AMB	Complexo XSMA	4,0 x 10 ⁴	<i>Lactobacilus spp.</i>
27/2299/2011	F/55	Transplante/AMB	Complexo XSMA	5,0 x 10 ⁴	<i>Lactobacilus spp.</i>
28/2300/2011	M/47	Transplante/AMB	<i>C. glucoronoliticum</i>	1,5 x 10 ⁴	SCN
29/2303/2011	F/25	Pré-Natal/AMB	<i>Corynebacterium sp.</i>	7,0 x 10 ³	<i>Streptococcus</i> α-hemolítico e SCN MDR
30/2307/2011	F/79	Ginecologia/ENF	Complexo XSMA	1,0 x 10 ⁵	<i>Proteus mirabilis</i>
31/2313/2011	F/50	Transplante/AMB	<i>Corynebacterium sp.</i>	3,0 x 10 ⁴	<i>Lactobacilus spp.</i>
32/2320/2011	F/55	Transplante/AMB	<i>Corynebacterium sp.</i>	6,0 x 10 ⁴	<i>Lactobacilus spp.</i>
33/2326/2011	F/49	Reumatologia	<i>Corynebacterium sp.</i>	1,0 x 10 ⁵	SCN
34/2327a/2011	M/38	Transplante/AMB	Complexo XSMA	2,3 x 10 ³	Complexo XSMA
35/2327b/2011	M/38	Transplante/AMB	Complexo XSMA	4,0 x 10 ⁴	Complexo XSMA
36/2328/2011	F/44	Nefrologia/ENF	<i>C. afermentans</i>	4,5 x 10 ³	<i>Arthrobacter spp.</i>
37/2330/2011	M/53	Nefrologia/AMB	<i>Corynebacterium sp.</i>	1,0 x 10 ⁴	NI
38/2344/2012	F/42	Nefrologia/AMB	CDC Grupo G	1,0 x 10 ⁴	SCN MDR
39/2348/2012	M/NI	PPC/AMB	<i>Corynebacterium sp.</i>	2,5 x 10 ⁴	<i>P. mirabilis</i>
40/2386/2012	F/NI	PPC/AMB	Complexo XSMA	6,0 x 10 ⁴	NI
41/2415/2012	F/72	PPC/AMB	<i>C. afermentans</i>	2,5 x 10 ³	<i>E. coli</i>

Legenda: F, feminino; M, masculino; AMB, ambulatório; ENF, enfermaria; NI, não informado; XSMA, *xerosis, striatum, minutissimum, amycolatum*; BGNF, bacilo Gram-negativo fermentador; BGNNF, bacilo Gram-negativo não fermentador; SCN, *Staphylococcus* coagulase negativa; MDR, multirresistente; PPC, policlínica Piquet Carneiro.

Figura 2 – Números de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas relacionados com as faixas etárias dos pacientes atendidos no HUPE/UERJ (Jan 2011-Jan 2013)

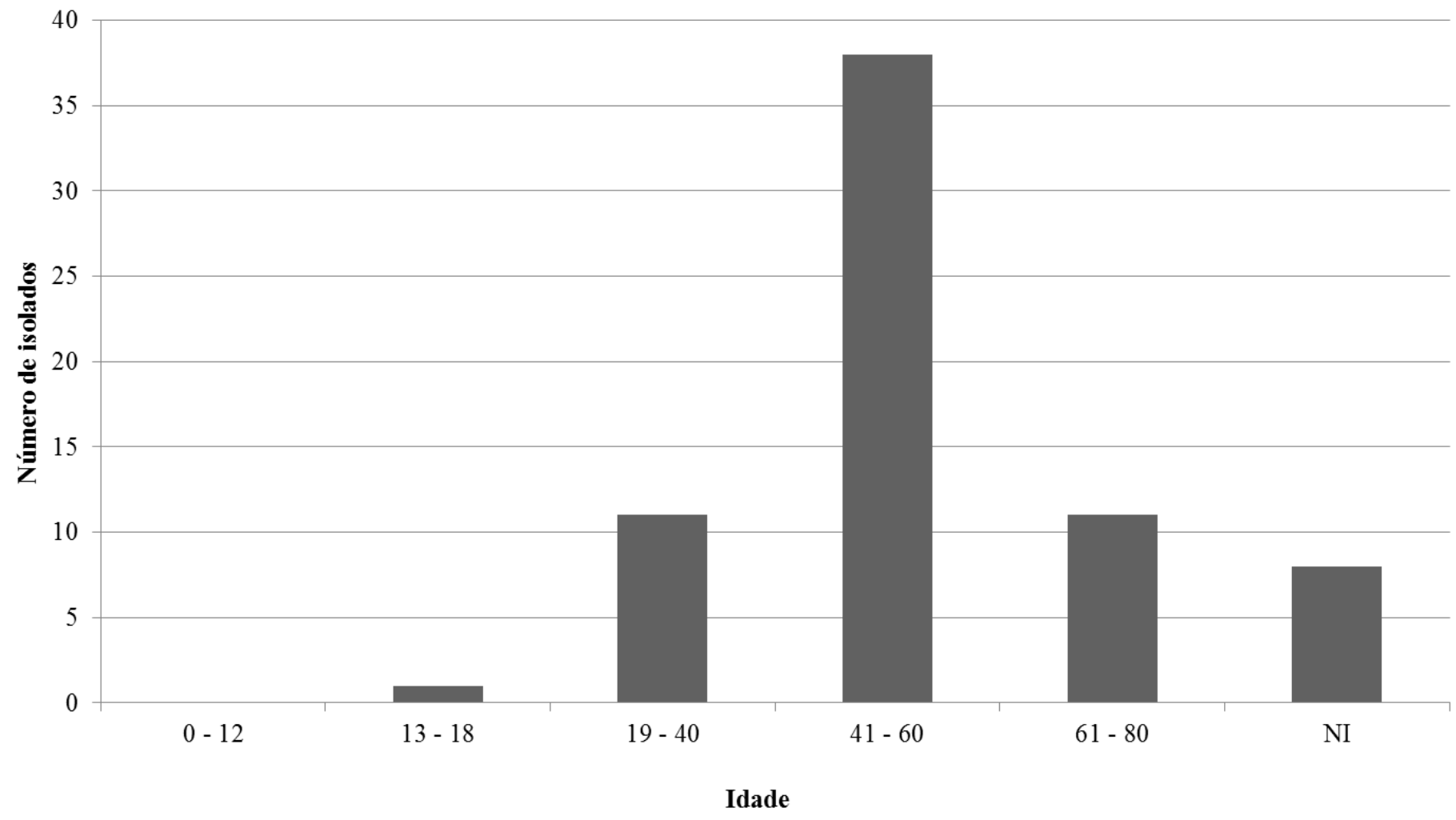


Figura 3 – Número (%) de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas de pacientes atendidos em diversos setores do HUPE/UERJ (Jan 2011-Jan 2013)

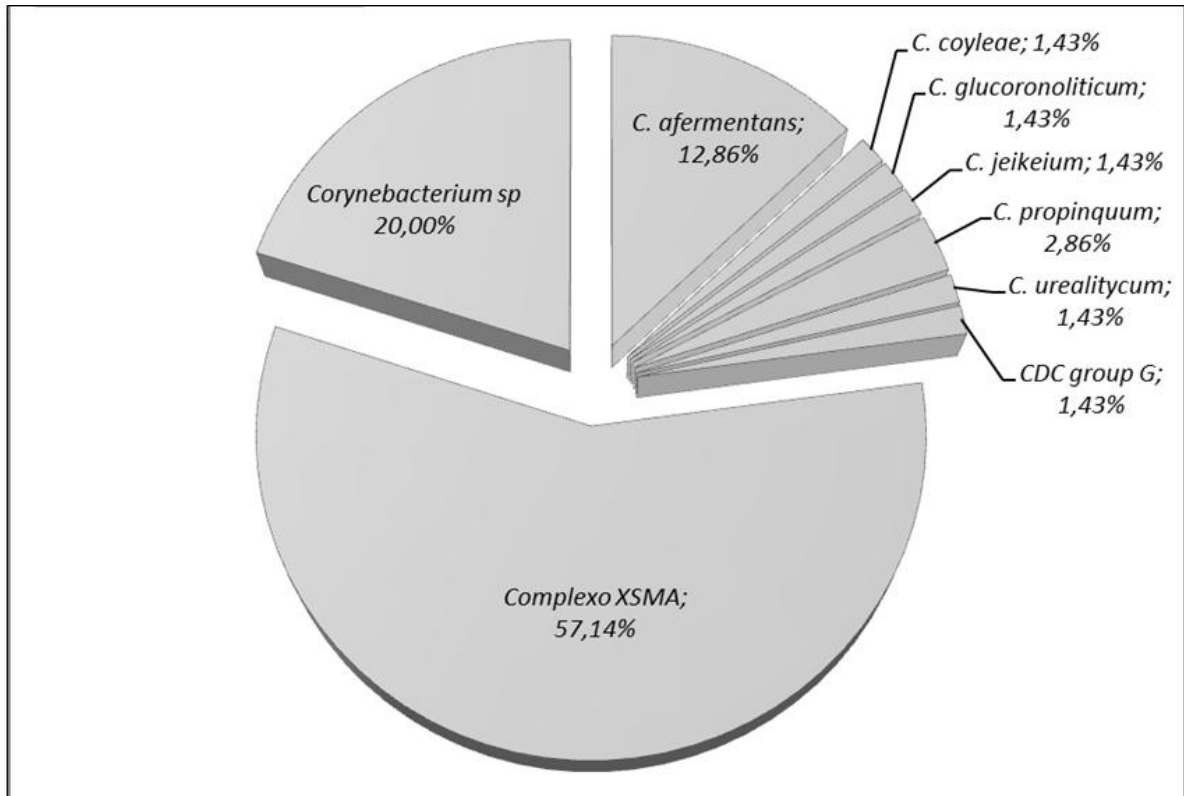


Tabela 4 – Perfis de susceptibilidade aos 14 agentes antimicrobianos testados pelo teste de difusão em disco de amostras de corinebactérias isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013)

Micro-organismo	Perfis e % de resistência aos agentes antimicrobianos														
	Multirresistência	Amp	Pen	Cef	Gen	Cip	Lin	Eri	Lzd	Sulf/Trim	Van	Rif	Tet	Imi	Nit
Complexo XSMA		V	V	V	V	V	V	V	S	V	S	V	V	V	V
		56	56	15	43	33	52	56	0	67	0	15	19	43	71
	1/MDR/10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R
	2/MDR/7	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R
	3/MDR/6	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R
	4/MDR/6	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	NT
	5/MDR/5	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	NT
	6/MDR/5	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	NT
	7/MDR/5	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
	8/MDR/5	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	NT
	9/MDR/5	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R
	10/MDR/4	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	NT
	11/MDR/4	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R
	12/MDR/4	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
	13/MDR/4	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
	14/MDR/4	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
	15/MDR/4	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
	16/MDR/4	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R
	17/MDR/4	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R
	18/MDR/3	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
	19/MDR/3	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R
	20/MDR/3	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
	21/MDR/3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
	22/MDS/2	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	23/MDS/2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
	24/MDS/1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
	25/MDS/1	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NT
26/MDS/1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
27/MDS/0	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
<i>C. fermentans</i>		V	V	S	S	V	V	V	S	V	S	S	V	V	R
		67	67	0	0	17	50	50	0	67	0	0	17	17	100
	1/MDR/5	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	NT
	2/MDR/4	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R
	3/MDR/5	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R
4/MDR/3	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	

	5/MDR/3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
	6/MDS/2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
<i>C. coyleae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDR/5	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R
<i>C. jeikeium</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDR/6	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
<i>C. urealitycum</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDS/0	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NT
<i>C. propinquum</i>		V	V	S	S	V	V	V	S	S	S	S	S	S	R
		50	50	0	0	50	50	50	0	0	0	0	0	0	100
	MDR/4	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	NT
	MDS/1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>C. glucuronoliticum</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDR/4	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
<i>CDC grupo G</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDR/6	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R
<i>Corynebacterium sp.</i>		V	V	V	V	V	V	V	S	V	S	V	S	V	R
		60	60	10	30	30	50	70	0	80	0	20	0	30	100
	1/MDR/6	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R
	2/MDR/6	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R
	3/MDR/6	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
	4/MDR/6	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	NT
	5/MDR/4	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	NT
	6/MDR/4	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R
	7/MDR/4	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R
	8/MDR/4	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	NT
	9/MDS/2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	10/MDS/2	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	NT

Legenda: R, resistente; S, sensível, V, variável; NT, não testado; MDR, multirresistente; MDS, multissensível; Amp, ampicilina; Pen, penicilina; Cef, cefotaxima; Gen, gentamicina; Cip, ciprofloxacina; Lin, lincomicina; Eri, eritromicina; Lzd, linezolida; Sulf/Trim, sulfametoxazol com trimetoprima; Van, vancomicina; Rif, rifampicina; Tet, tetraciclina; Imi, imipenem; Nit, nitrofurantóina.

Tabela 5 – Características fenotípicas de amostras relacionadas ao Complexo XSMA isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013)

Amostra/Ano de isolamento	Produção de ácido								
	Nitrato	Urease	Esculina	Glicose	Maltose	Sacarose	Manitol	CAMP	Tirosina
2209/2011	-	-	-	+	-	+	-	+	NT
2213/2011	-	-	-	+	+	+	-	-	NT
2215/2011	-	-	-	+	+	-	-	-	NT
2217/2011	-	-	-	+	(+)	+	-	-	NT
2218/2011	-	-	-	+	+	+	-	+	NT
2220/2011	-	-	-	+	+	+	-	-	NT
2224/2011	-	-	-	+	(+)	+	-	-	NT
2226/2011	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	NT
2227/2011	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	NT
2246/2011	+	-	-	(+)	(+)	(+)	-	+	NT
2254b/2011	-	-	-	+	+	-	-	-	NT
2257a/2011	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	NT
2265/2011	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	NT
2267/2011	-	-	-	(+)	-	-	-	-	NT
2271/2011	-	-	-	+	(+)	-	-	-	NT
2274/2011	-	-	-	+	+	+	-	-	NT
2280/2011	+	-	-	+	+	+	+	-	NT
2281/2011	-	-	-	+	+	-	-	-	NT

2293/2011	+	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	NT
2299/2011	-	-	-	+	+	+	-	-	+
2307/2011	+	-	-	+	-	-	-	-	+
2327a/2011	-	-	-	+	-	+	-	-	-
2327b/2011	-	-	-	+	-	(+)	-	+	-
2342/2012	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2349/2012	-	-	-	+	+	-	-	-	NT
2352/2012	+	-	-	+	+	+	-	-	+
2356/2012	+	-	-	+	+	+	-	-	NT
2361/2012	-	-	-	+	-	-	-	-	NT
2362/2012	-	-	-	+	-	+	-	-	NT
2367/2012	-	-	-	+	+	+	-	+	-
2368/2012	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2374/2012	+	-	-	+	+	+	-	-	-
2380/2012	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2386/2012	-	-	-	+	-	+	-	-	(+)
2388/2012	-	-	-	+	+	+	-	-	+
2393/2012	+	-	-	+	-	-	-	-	-
2400/2012	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2416/2012	-	-	-	+	+	+	-	-	+
2417/2012	+	-	-	+	+	-	-	-	-
2426/2012	-	-	-	+	+	+	-	-	+

Legenda: -, Negativo; +, Positivo; (+), Reação positiva fraca; NT, Não testado.

Tabela 6 – Perfis fenotípicos de amostras não relacionadas ao complexo XSMA isoladas de urinoculturas obtidas de pacientes tratados em diferentes setores hospitalares (HUPE/UERJ) (Jan 2011-Jan 2013)

Perfil fenotípico	Amostra/ Ano isolamento	Produção de ácido para:								
		Nitrato	Urease	Esculina	Glicose	Maltose	Sacarose	Manitol	CAMP	Tirosina
<i>C. afermentans</i>	2206/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2214/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2231/2011	-	-	-	-	-	-	-	+	NT
	2254a/2011	-	-	-	(+)	-	-	-	+	NT
	2258/2011	-	-	-	-	-	-	-	+	NT
	2266/2011	-	-	-	-	-	-	-	+	NT
	2270/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2328/2011	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	2415/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>C. coyleae</i>	2216/2011	-	-	-	-	-	-	-	+	NT
<i>C. jeikeium</i>	2329/2011	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. urealitycum</i>	2340/2011	-	+	-	-	-	-	-	-	NT
<i>C. propinquum</i>	2256/2011	+	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2257b/2011	+	-	-	-	-	-	-	-	NT
<i>C. glucoronoliticum</i>	2300/2011	-	-	-	+	-	(+)	-	+	-
<i>CDC group G</i>	2344/2012	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Corynebacterium</i> <i>sp.</i>	2278/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2289/2011	-	-	-	-	-	-	-	+	NT
	2303/2011	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	2313/2011	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-
	2320/2011	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	2326/2011	-	+	-	+	+	+	-	-	-
	2330/2011	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2232/2011	-	(+)	-	-	-	-	-	-	NT
	2335/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2337/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2342/2012	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2348/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2412/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	2450/2013*	-	-	-	+	-	-	-	-	NT

Legenda: -, Negativo; +, Positivo; (+), Fracamente positivo; NT, Não testado; *, Amostra empregada nos estudos adicionais relativos da eficácia de diferentes métodos laboratoriais de identificação e do potencial de virulência da espécie *C. mycetoides*.

4.2 Identificação e determinação do potencial patogênico de espécie rara de corinebactéria a partir de urinocultura de paciente com ITU atendido no HUPE/UERJ

4.2.1 Identificação bacteriana

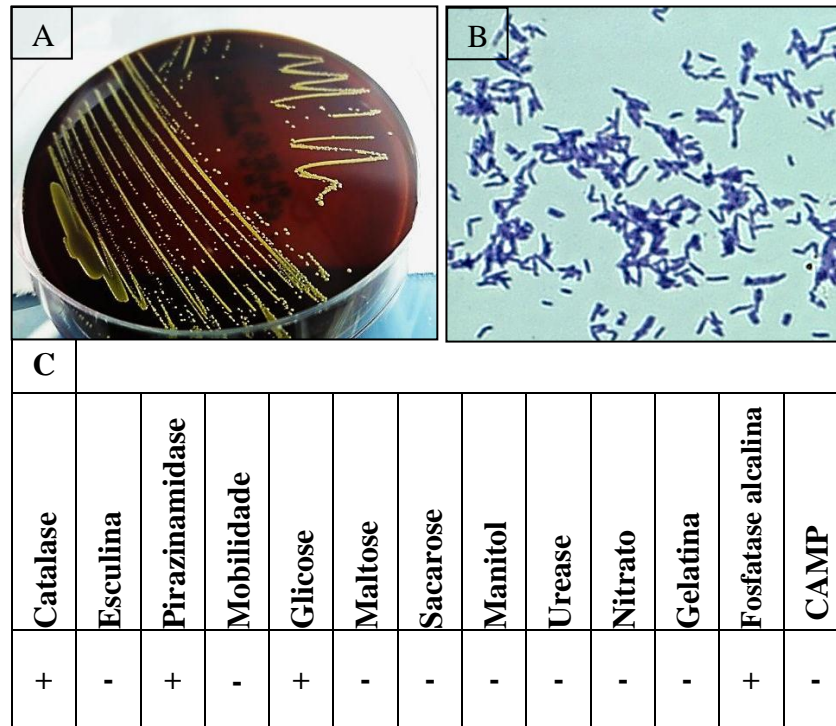
4.2.1.1 Análise empregando testes fenotípicos convencionais

Conforme apresentado na **Figura 4**, após incubação por 24/48h à 37°C em aerobiose em Ágar Sangue de carneiro a 5%, a amostra 2450, isolada de paciente submetido a transplante renal, apresentou crescimento abundante, com aspecto brilhante, pigmento amarelo forte, aspecto mucóide, não hemolítica, medindo cerca de 1mm (**Figura 4A**). Apesar de exibir morfologia colonial incomum às espécies de corinebactérias relacionadas com processos infecciosos em humanos, a análise microscópica pelo método de Gram demonstrou que a cepa isolada em cultura pura apresentava-se morfologia celular compatível com BGPIs com formas cocobacilares e claviformes de tamanhos variados (**Figura 4B**). Apesar de ter sido utilizado um conjunto de 13 testes fenotípicos convencionais (**Figura 4C**) os resultados não permitiram a identificação da amostra a nível de espécie utilizando tabelas de identificação de bacilos Gram-positivos disponíveis na literatura. Com base nos resultados, o isolado foi agrupado no gênero *Corynebacterium*.

4.2.1.2 Análise fenotípica por sistemas semi-automatizados

Conforme demonstrado na **Tabela 6**, os três testes semi-automatizados utilizados no presente estudo forneceram resultados diferentes entre si e mostraram-se incapazes de identificar corretamente a amostra 2450 como *C. mycetoides*. O sistema Api Coryne identificou a amostra como *Corynebacterium argentoratense*, enquanto o sistema de identificação rápida RapID CB Plus, chegou a dois resultados distintos e apontou como questionável a sua conclusão, orientando que fosse verificada a pureza da amostra e repetido o teste, identificando a amostra como *Brevibacterium spp.* O código 1544051001 não apresentou correlação com as espécie incluídas no programa de identificação utilizado no sistema BBL Crystal.

Figura 4 – Características morfológicas e bioquímicas de *Corynebacterium mycetoides* 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado



Legenda: (A) Crescimento da amostra *C. mycetoides* 2450 e meio Agar Sangue. (B) Coloração de Gram da amostra *C. mycetoides* 2450. (C) Características fenotípicas da amostra *C. mycetoides* 2450.

Tabela 7 – Resultados das análises fenotípicas convencional e semi-automatizadas e moleculares de *Corynebacterium mycetoides* 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado renal.

Amostra	Fenotípico									
	Convencional		API Coryne		RapID CB Plus			BBL Crystal		
	Espécie	Espécie	Score %	Código	Espécie	Score %	Código	Espécie	Score %	Código
2450	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>C. argentoratense</i>	79.2	2100104	<i>Brevibacterium sp.</i>	93.7	0006013	NI	NI	1544051001

Legenda: NI, não informado.

4.2.1.3 Identificação molecular por MALDI-TOF e sequenciamento de genes conservados 16S rRNA e *rpoB*

O método MALDI-TOF baseia-se na combinação da aplicação da espectrometria de massa, que analisa o componente proteico dos micro-organismos, com dados de bioinformática. Apenas o método molecular MALDI-TOF permitiu a especificação correta da amostra 2450 como *C. mycetoides* em concordância com os resultados do sequenciamento de genes conservados 16S rRNA e *rpoB* (**Tabela 7**). A análise por MALDI-TOF identificou a amostra tanto a nível de gênero quanto a nível de espécie. O isolado apresentou semelhança (*score* de 2,214) com a cepa *C. mycetoides* DSM 20632T DSM, sob o número de identificação no NCBI (National Center for Biotechnology Information) de 38302.

4.2.2 Avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos através do método de difusão em ágar

A amostra 2450 expressou o perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos apresentado na **Tabela 8** e foi definida como MDR por exibir resistência aos antimicrobianos eritromicina, clindamicina e nitrofurantoína.

4.2.3 Análise do potencial patogênico da amostra *C. mycetoides* 2450

4.2.3.1 Aderência e produção de biofilme em superfícies abióticas diversas

Produção de biofilme em superfície (hidrofílica e de carga positiva) de vidro - Os resultados ilustrados na **Figura 5A** demonstraram que a amostra 2450 de *C. mycetoides* (Tubo I) foi incapaz de aderir e de produzir biofilme na superfície do vidro, a semelhança da amostra *C. diphtheriae* CDC-E8392 utilizada como controle-negativo (Tubo II; padrão IV).

Tabela 8 – Resultados das análises moleculares de *Corynebacterium mycetoides* 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado renal

Amostra	Genotípico			
	MALDI-TOF		Sequenciamento	
	Espécie	Score	16S rRNA Espécie	<i>rpoβ</i> Espécie
2450	<i>Corynebacterium mycetoides</i>	2.214	<i>Corynebacterium mycetoides</i>	<i>Corynebacterium mycetoides</i>

Tabela 9 – Perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos determinada pelo método disco difusão de *Corynebacterium mycetoides* 2450 isolada de urinocultura de um paciente transplantado renal

Antimicrobianos	<i>C. mycetoides</i> 2459
Penicilina G*	S
Ampicilina*	S
Cefotaxima**	S
Gentamicina**	S
Sulfametoxazol/Trimetroprima#	S
Nitrofurantoina#	R
Eritromicina*	R
Imipenem**	S
Clindamicina**	R
Linezolida*	S
Ciprofloxacina**,#	S
Tetraciclina**	S
Rifampicina**	S
Vancomicina**	S
	MDR

Legenda: #, usualmente utilizados tratamento de ITU. *, pontos de corte sugeridos pelo CLSI M100/2016; **, pontos de corte sugeridos pelo BrCAST/2016. S, suscetível; R, resistente; MDR, multirresistente.

Produção de biofilme em superfície de poliestireno (hidrofílico e de carga negativa) - A análise pelo método semi-quantitativo em microplacas de poliestireno demonstrou que a amostra *C. mycetoides* 2450 strain expressou capacidade de produção de biofilme (48h incubação) (fraca+: $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$), porém em níveis inferiores ao observado para a amostra *C. diphtheriae* CDC-E8392 utilizada como controle positivo (**Figura 5B**).

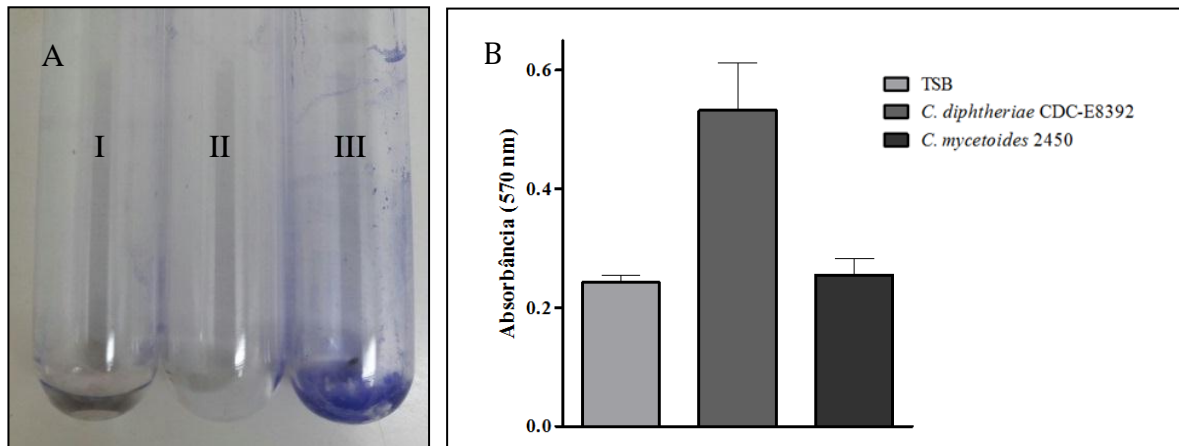
Aderência e viabilidade bacteriana em superfícies de diferentes tipos de catéteres (poliuretano, silicone e látex) - Micrografias apresentadas na **Figura 6** demonstraram que *C. mycetoides* é capaz de expressar formas celulares sésseis capazes de aderirem e permanecerem viáveis em superfícies de diferentes tipos de catéteres. A amostra 2450 apresentou crescimento confluyente no meio de cultura em toda extensão do rolamento de segmentos de catéteres de poliuretano (**Figura 6A**), silicone (**Figura 6B**) e látex (**Figura 6C**).

4.2.3.2 Infecção de nematódeos *C. elegans* por *C. mycetoides*

Letalidade em C. elegans – Na **Figura 7A** encontram-se as curvas de sobrevivência de *C. elegans* obtidas nos ensaios de infecção com o isolado clínico de *C. mycetoides* e a cepa *E. coli* OP50, comumente utilizada para manutenção destes animais em laboratório. É possível observar que 50% dos nematódeos foram mortos por *C. mycetoides* em apenas 3 dias de infecção, enquanto que a cepa *E. coli* OP50 foi capaz de causar redução de apenas 10 % no número de animais durante este período. Após 5 dias de interação, 90 % dos nematódeos ainda permaneciam viáveis na presença da cepa *E. coli* OP50. Contudo, apenas 40 % dos animais sobreviveram à infecção pelo isolado clínico.

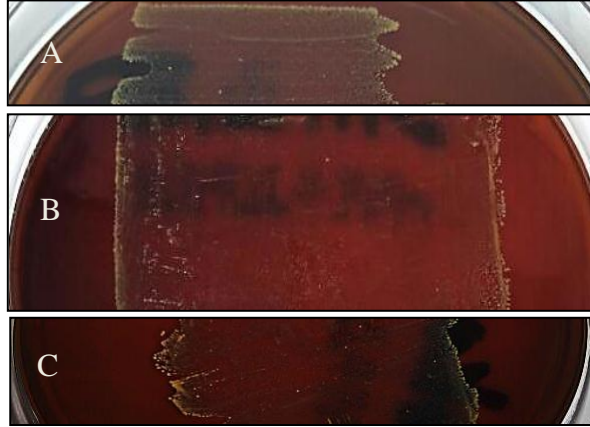
Indução do efeito bagging em C. elegans - Além de analisar a sobrevivência dos nematódeos durante a realização dos ensaios de infecção, foi investigada a indução do efeito *bagging* pelo isolado clínico. A partir do segundo dia de experimento, foi observada a eclosão de ovos no interior de um dos vermes adultos mortos (**Figura 7B**). Contudo, não foi possível realizar a contagem das larvas viáveis devido a grande quantidade das mesmas no interior deste nematódeo.

Figura 5 - Aderência e produção de biofilme pela amostra *C. mycetoides* 2450 nas superfícies do vidro e poliestireno



Legenda: (A) Análise qualitativa da formação de biofilme na superfície do vidro. (B) Análise quantitativa da formação de biofilme na superfície do poliestireno. I, Formação de biofilme pela amostra *C. diphtheriae* CDC-E8392 (controle-negativo). II, Formação de biofilme pela amostra *C. mycetoides* 2450. III, Formação de biofilme pela amostra *C. diphtheriae* TR 241 (controle-positivo).

Figura 6 - Micrografias dos tapetes bacterianos formados após o rolamento de diferentes tipos de catéteres contendo o biofilme da amostra *C. mycetoides* 2450



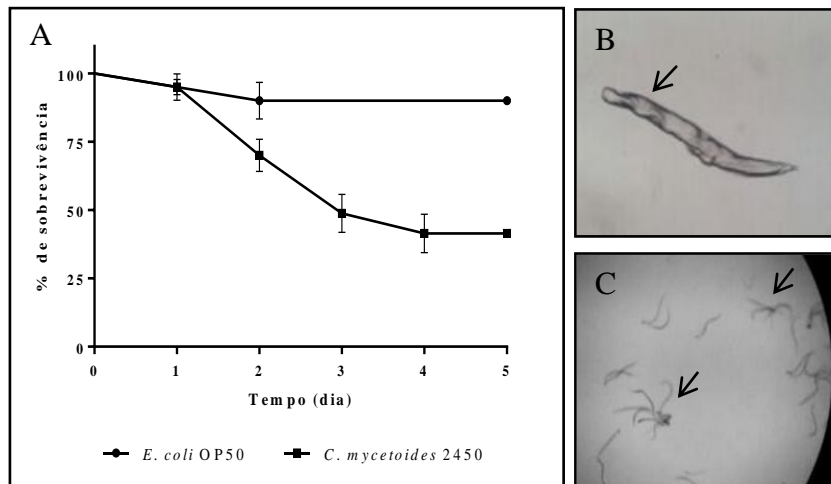
Legenda: (A) Rolamento do cateter de poliuretano. (B) Rolamento do cateter de silicone. (C) Rolamento do cateter de látex.

Formação de star em C. elegans – Dois agregados de vermes em forma de estrela (*star*) foram visualizados entre o segundo e o terceiro dias de experimento nos poços contendo 150 µl da suspensão de *C. mycetoides*. As formações de *star* foram observadas tanto em nematódeos adultos quanto em larvas (**Figura 7C**). Após o terceiro dia, as formações não puderam mais ser observadas devido a decomposição dos vermes mortos por *C. mycetoides*. Como esperado, não foram observadas formação de *star* durante todo o período nos poços contendo *E. coli* OP50.

4.2.3.3 Interação de *C. mycetoides* com células de linhagem contínua Vero.

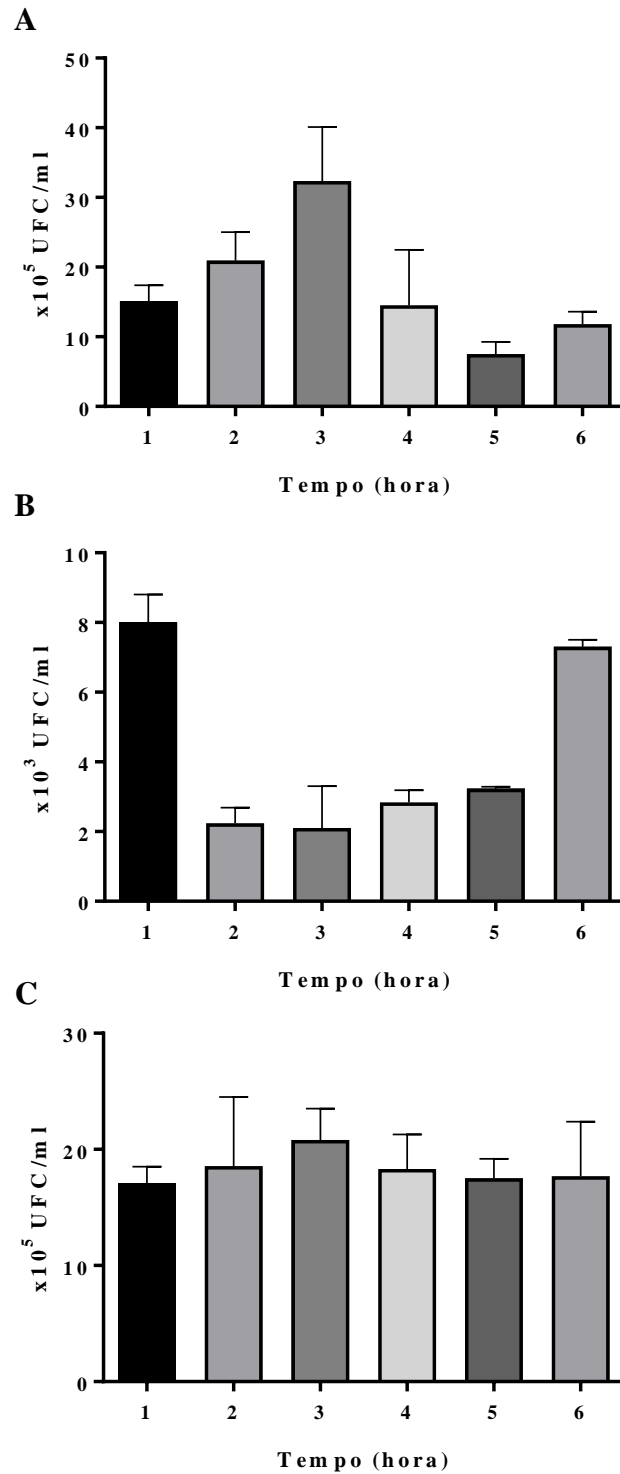
Os ensaios realizados com células eucarióticas revelaram que o isolado clínico *C. mycetoides* 2450 é capaz de aderir às células renais em intensidades que variam de acordo com o tempo de interação, sendo o pico de aderência observado 3 h após a infecção (**Figura 8A**), quando cerca de 59 ± 3 % das bactérias estavam associadas. Além disso, micro-organismos foram encontrados viáveis no interior das células renais em todo o tempo de infecção, sobretudo após 1 e 6 h de infecção (**Figura 8B**), quando aproximadamente $0,57 \pm 0,05$ % e $0,68 \pm 0,02$ % das bactérias estavam associadas, respectivamente. O número de micro-organismos viáveis não aderidos ou internalizados, presentes no sobrenadante, permaneceu constante ao longo do teste (**Figura 8C**).

Figura 7 – *C. elegans* como modelo experimental *in vivo* para avaliação do potencial patogênico de *C. mycetoides*



Legenda: (A) Curvas de sobrevivência de *C. elegans* na presença de *C. mycetoides* 2450 e *E. coli* OP50 (controle do experimento). (B) Formação de star observada após 2 dias de incubação com 150 μ L de *C. mycetoides* 2450. (C) Eclosão de ovos no interior de um nematódeo morto (efeito *bagging*) induzida pela amostra *C. mycetoides* 2450.

Figura 8 – Interação de *C. mycetoides* 2450 com células epiteliais renais (Vero) por diferentes períodos de incubação



Legenda: UFC, Unidade Formadora de Colônia. (A) Contagem de bactérias associadas ao tapete celular (aderidas e internalizadas). (B) Contagem de bactérias internalizadas. (C) Contagem de bactérias presentes no sobrenadante.

5 DISCUSSÃO

As ITU são consideradas um grave problema de saúde pública em todo mundo. Podem ser causadas por uma variedade de patógenos, sendo as bactérias Gram-negativas entéricas, como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, as mais frequentemente associadas (FLORES-MIRELES et al., 2015). Micro-organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus saprophyticus*, *E. faecalis* e *Streptococcus agalactiae*, também são importantes agentes etiológicos de ITU, particularmente em idosos, gestantes e pacientes oncológicos ou que apresentem com outros fatores de risco para estas infecções. Outras espécies bacterianas Gram-positivas, sobretudo dos gêneros *Aerococcus*, *Actinobaculum*, *Gardnerella* e *Corynebacterium* vêm emergindo como agentes causadores destas infecções. Contudo, dificuldades no isolamento e identificação laboratorial, em parte devido à carência de testes e procedimentos padronizados para caracterização destes gêneros em laboratórios microbiológicos de rotina, levam a perda dos isolados e, assim, à subnotificação dos casos. Mais do que isso, estas espécies têm seu potencial como uropatógenos subestimado (KLINE; LEWIS, 2016).

Corynebacterium é um gênero amplamente difundido no ambiente e que faz parte da microbiota de pele e mucosa em humanos. Casos de infecções por diversas espécies de corinebactérias, sobretudo por amostras multirresistentes (MDR), têm sido cada vez mais frequentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos com internações recentes e em pacientes imunocompetentes com histórico de cirurgias de implantes de dispositivos médicos, levando diversos autores a considerar estas espécies como oportunistas, principalmente em ambientes nosocomiais (PACHECO et al., 2015; HONG et al., 2016).

Na literatura são comuns relatos da dificuldade de identificação destas corinebactérias patogênicas emergentes, o que contribui para a desvalorização microbiológica e clínica dos isolados, e dificulta a escolha do esquema de identificação para o diagnóstico laboratorial e a antibioticoterapia. A identificação das corinebactérias, de fato, permanece um desafio devido à diversidade de espécies envolvidas em processos infecciosos em humanos e animais, à frequente reclassificação taxonômica e o requerimento de procedimentos fastidiosos e técnicas moleculares (BERNARD, 2012; COYLE; LIPSK, 1990; KHAMIS et al., 2004; 2005; PACHECO et al., 2015; SAVINI et al., 2013 YOON et al., 2011). Atualmente, dentre as técnicas reconhecidamente mais confiáveis utilizadas nos últimos anos estão o sequenciamento dos genes *rpoB* e 16S rRNA (KHAMIS et al., 2004) e a espectrometria de massa (MALDI-TOF) (ALATOOM et al., 2012; KONRAD et al., 2010; VILA et al., 2012).

Na pesquisa previamente realizada por Camello e colaboradores (2003), diversas amostras de corinebactérias foram isoladas de pacientes atendidos no HUPE-UERJ, no período de setembro de 1993 a dezembro de 1998. A maior parte destas foi oriunda de quadros de ITU (20,24%). Nesta oportunidade, a espécie *C. pseudodiphtheriticum* e aquelas que compõem o Complexo XSMA foram as mais prevalentes. No presente trabalho, realizado com urinoculturas de pacientes atendidos no mesmo hospital, foram isoladas 69 amostras de corinebactérias, sendo as espécies pertencentes ao Complexo XSMA as predominantes. Diferentemente dos resultados obtidos por Camello e colaboradores (2003), amostras de *C. pseudodiphtheriticum* não foram isoladas. Além disso, foi detectada a presença de outras espécies de corinebactérias, tais como, *C. coyleae* e *C. mycetoides* entre os isolados, indicando uma mudança no panorama epidemiológico.

As amostras de corinebactérias obtidas neste estudo foram majoritariamente isoladas de pacientes assistidos pelo setor de Transplante do HUPE-UERJ e que realizavam acompanhamento em ambulatório. Além disso, foram em sua maior parte oriundas de pacientes adultos do sexo feminino, com idades que variavam entre 41 e 60 anos. Estes achados corroboram pesquisas realizadas previamente. Segundo Kline e Lewis (2016), bactérias Gram-positivas são mais frequentemente relatadas como agentes etiológicos das ITU não complicadas em gestantes e idosos. Mais do que isso, os mesmos autores sugerem que indivíduos portadores de alterações estruturais ou funcionais no trato urinário, desordens metabólicas ou imunológicas, e cateterizados compõem um grupo de risco para ITU complicada por estes mesmos micro-organismos. Em particular, o isolamento de corinebactérias em ITU está diretamente relacionado ao comprometimento do sistema imunológico dos pacientes, sobretudo daqueles com longo tempo de internação ou de transplantados (CAMELLO et al., 2009; CHOE et al., 2012; DIAS et al., 2010; FERRER et al., 2001; FUNKE et al., 1998; HERTIG et al., 2000; LÓPEZ et al., 2009; PRETE et al., 2008; VEDEL et al., 2006; VERDAGUER et al., 2008; VILLANUEVA et al., 2002)

No presente estudo, foi também possível isolar amostras de corinebactérias em associação com outros micro-organismos. Atualmente, a natureza polimicrobiana de algumas ITU, envolvendo frequentemente uma ou mais espécies de bactérias Gram-positivas, tem sido considerada, sobretudo em pacientes idosos, imunocomprometidos, cateterizados e portadores de HIV, neoplasias e diabetes (KLINE; LEWIS, 2016). O desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo do sinergismo entre micro-organismos isolados nestas culturas tem contribuído para este reconhecimento. Resultados obtidos até o momento demonstram que, apesar de serem rapidamente eliminadas da bexiga, algumas bactérias Gram-positivas

podem impactar a patogênese dos micro-organismos associados, contribuindo para a progressão do processo infeccioso (ALTERI et al., 2015; ARMBRUSTER et al., 2014; HJELM et al., 1987; KLINE et al., 2012; 2014; MOBLEY; WARREN, 1987; TSUCHIMORI et al., 1994). Casos de bacteremia, nos quais foram isoladas as mesmas espécies de micro-organismos na urina e no sangue, corroboram estes achados (BISHARA et al., 1997; SIEGMAN-IGRA et al., 1993; WOODS; WATANAKUNAKORN, 1996). Contudo, segundo Kline e Lewis (2016), o crescimento polimicrobiano precisa ser analisado cuidadosamente, levando em consideração fatores como a contagem bacteriana, espécies encontradas e as condições clínicas de cada paciente. Diante do exposto, é possível especular que alguns dos casos analisados no presente trabalho tenham de fato uma natureza polimicrobiana, mas estudos acerca da existência do sinergismo entre as espécies encontradas são necessários para confirmar esta hipótese.

A emergência da resistência antimicrobiana de espécies de *Corynebacterium* tem sido descrita principalmente em pacientes com longos períodos de internação (QIN et al., 2016). Neste contexto, é comum o aparecimento de surtos epidêmicos importantes por estas espécies (VERROKEN et al., 2014). A multirresistência já foi descrita para algumas espécies deste grupo, dentre as quais: *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. kroppenstedtii*, *C. urealyticum* e *C. imitans*, isolados de casos de infecção de cateter de hemodiálise (SCHIFFL et al., 2004), bacteremias (QIN et al., 2016), abscessos de mama (FERNÁNDEZ-NATAL et al., 2015), cistite encrustativa (GUIMARÃES et al., 2015) e infecção respiratória (MÖLLMANN et al., 2014), respectivamente. A resistência aos agentes antimicrobianos expressa por essas espécies de corinebactérias tem sido observada com mais frequência para os seguintes antimicrobianos: sulfametoxazol com trimetoprima, penicilina e outros beta- lactâmicos, ciprofloxacino, azitromicina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, canamicina e estreptomicina. Já foram relatados casos de isolamento de *C. jeikeium* apresentando sensibilidade apenas para vancomicina (MARTINS et al., 2009). A resistência a tais antimicrobianos foi identificada não apenas mediante a análise laboratorial, através dos testes de susceptibilidade, mas também às análises moleculares com a identificação dos genes de resistência. No presente estudo, amostras de corinebactérias com perfis MDR foram também encontradas. Foi observada resistência a lincomicina, eritromicina, sulfametoxazol com trimetoprima e nitrofurantoína. A resistência para sulfametoxazol com trimetoprima e nitrofurantoína destaca-se, uma vez que ambos antimicrobianos são comumente utilizados como tratamento empírico de primeira escolha para o tratamento de ITU (ANVISA, 2008; WARREN et al., 1999). Até o presente momento não foram encontrados registros literários de

espécies de corinebactérias resistentes a linezolida e vancomicina, o que corrobora os resultados encontrados neste trabalho (CARVALHO, 2015).

As corinebactérias estão tão disseminadas no ambiente e nos animais que é comum a descrição de novas espécies a cada ano. Somente em 2016 três novas espécies foram isoladas de animais (BRAUN et al., 2016; CHEN et al., 2016; ZIMMERMANN et al., 2016). No presente estudo, houve o isolamento de uma amostra da espécie *C. mycetoides* a partir da cultura de urina de uma paciente do sexo feminino, transplantada, portadora do vírus da hepatite C e com histórico de ITU recorrentes.

A espécie identificada atualmente como *C. mycetoides* foi isolada pela primeira vez em 1942 por Castellani de culturas de úlcera tropicalóide que acometiam soldados em regiões desérticas da África. Nesta oportunidade, o isolado foi classificado como *Micrococcus mycetoides* e descrito como coco Gram-negativo fastidioso, que após sucessivas sementeiras assumia forma cocobacilar ou bacilar em cadeias e tornava-se Gram-positivo ou Gram-lábil. Vale ressaltar que Castellani já mencionava a presença de células claviformes. No ano seguinte, Negro, considerando a semelhança morfológica com os micro-organismos do gênero *Streptococcus*, modificou a classificação deste isolado e passou a identificá-lo como *Streptococcus mycetoides*. Alguns anos depois, em 1949, Castellani sugeriu outra mudança taxonômica, chamando-o de *Coccobacillus mycetoides*. Contudo, o mesmo autor solicitou que essa classificação fosse considerada temporária.

Ao longo dos anos, nos casos de úlcera tropicalóide estudadas em diferentes locais do mundo, como na América Central, África, Espanha, Portugal, Itália e no Extremo Oriente, foram encontradas cepas com características semelhantes às do micro-organismo isolado em 1942, indicando que esta espécie é de fato o agente etiológico desta infecção. Nestes estudos, os isolados foram descritos por vários autores como pleomórficos e que assumiam forma cocóide ou bacilar claviforme de acordo com o meio de cultura e a fase de crescimento (CASTELLANI, 1943; 1955; CAO PINNA; CAPOCCACCIA, 1954). Em relação à sua coloração, foram encontrados relatos controversos. Diferentemente de Castellani (1943), diversos autores apontaram a coloração Gram-positiva (CAO PINNA; CAPOCCACCIA, 1954; CAPOCCACCIA; CAO PINNA, 1953; CASTELLANI et al., 1949; URSO; TRIPODI, 1949). Capocaccia e Cao Pinna (1953) ressaltaram a prevalência da forma bacilar claviforme e Gram-positiva quando o micro-organismo fora cultivado em meio de cultura rico, como Loeffler e ágar caseína. Devido a estes relatos, Pergola (1954) renomeou taxonomicamente a espécie, incluindo-o no gênero *Corynebacterium*.

Mungelluzzi e Caprilli (1965) descrevem os micro-organismos da espécie *C. mycetoides* como cocóides, portadores de grânulos metacromáticos em suas extremidades, não esporulados e imóveis. Quando cultivados em meio sólido, tendem a apresentar colônias pequenas, com tendência à confluência, e apresentam um pigmento amarelado. Metabolicamente são capazes de fermentar somente a glicose, mas podem utilizar glicose, frutose e trealose. Quando submetidos a testes enzimáticos, somente produzem fosfatase. A amostra de *C. mycetoides* isolada no presente estudo apresentou basicamente as mesmas características fenotípicas descritas por este autor. Contudo, utilizando os esquemas de identificação fenotípicos tradicionais, não foi possível chegar à identificação do isolado no nível de espécie. Esta foi somente possível após a realização do sequenciamento gênico e da espectrometria de massa. Estas duas técnicas têm se mostrado determinantes quando há carência de informações a respeito de espécies raras e/ou novas que eventualmente aparecem nos laboratórios de rotina. Em particular, a utilização das mesmas para identificação de *Corynebacterium spp.* tem sido considerada promissora e confiável frente à identificação fenotípica nas rotinas laboratoriais (ALATOOM et al., 2012; BARBERIS et al., 2014).

Os sistemas de identificação semi-automatizados apresentaram resultados divergentes entre si e em relação às técnicas moleculares. Uma explicação para este fato seria a ausência dessa espécie no banco de dados destes testes, o que é comum quando a espécie é raramente isolada ou foi recentemente descrita. Nestes casos, o sistema informa falha na identificação ou fornece identificação errônea, resultante da semelhança dos resultados obtidos com o padrão fenotípico de outra espécie contida no seu banco de dados (ADDERSON et al., 2008). Outro problema comum com estes sistemas é a dificuldade de identificação de micro-organismos pigmentados, em particular, portadores do pigmento amarelo (FUNKE et al., 1998), como o da amostra de *C. mycetoides*.

Na análise da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, Mungelluzzi e Caprilli (1965) observaram sensibilidade de *C. mycetoides* para a estreptomicina e bacitracina, e resistência intermediária ao cloranfenicol, penicilina e terramicina. No presente trabalho, a amostra de *C. mycetoides* apresentou resistência a eritromicina, clindamicina e nitrofurantoína. Apesar de até o momento não ter sido encontrado na literatura relato de infecção em outros sítios por esta espécie, a resistência a nitrofurantoína, primeira droga de escolha para o tratamento de ITU, sugere que *C. mycetoides* pode se comportar como uropatógeno oportunista. A fim de testar esta hipótese, foi investigada a patogenicidade da amostra 2450 através de diferentes modelos experimentais já padronizados para o estudo de virulência de *C. diphtheriae*, patógeno reconhecido do gênero *Corynebacterium*.

Primeiramente, o potencial patogênico deste isolado clínico foi investigado através do modelo experimental *in vivo* utilizando *C. elegans*. Este é um nematódeo de vida livre, encontrado no solo em diversas partes do mundo. Alguns fatores o tornam um prático e eficiente modelo *in vivo* para experimentos de patogenicidade bacteriana: apresenta cerca de 1 mm de comprimento, é transparente, pode ser facilmente manipulado geneticamente e mantido em laboratório, utilizando a cepa *E. coli* OP50 como alimento, além de possuir um sistema imune cuja resposta é muito semelhante à resposta imune inata humana (RIDDLE, 1997; SIFRI et al., 2005). Muitos fatores de virulência de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, importantes para a infecção no nematódeo têm se mostrado determinantes também para o desenvolvimento do processo infeccioso no hospedeiro mamífero (SIFRI et al., 2005). Diversos outros modelos experimentais *in vivo* utilizando invertebrados têm sido desenvolvidos na última década e testados para análise da patogenicidade de corinebactérias. Contudo, o modelo com *C. elegans* é ainda considerado o mais útil para avaliar a patogenicidade deste grupo bacteriano (BROADWAY et al., 2013; OTT et al., 2012).

Assim como observado previamente com amostras de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* (ANTUNES et al., 2015a, 2015b; SANTOS et al., 2015; OTT et al., 2012) a interação de *C. mycetoides* com os nematódeos foi capaz de alterar significativamente a sobrevivência destes. Além disso, foi possível observar a indução do efeito *bagging* por *C. mycetoides*. Este fenômeno, observado previamente na presença de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *E. faecalis* e cepas virulentas de *E. coli* (ANTUNES et al., 2015; MOSSER et al., 2011), é considerado uma resposta adaptativa do nematódeo, realizada pelo verme adulto com a finalidade de oferecer proteção física e nutrição para as larvas (CHEN; CASWELL-CHEN, 2003). Um terceiro indício de patogenicidade de *C. mycetoides* foi a visualização da formação de *star* pelos nematódeos durante a infecção pelo isolado clínico. Estes agregados são formados durante a colonização da superfície dos vermes por algumas amostras patogênicas, como *C. diphtheriae*, *C. uclerans* e *Leucobacter* sp (ANTUNES et al., 2015b; HODGKIN et al., 2013). Acredita-se que estes agregados impeçam o escape dos nematódeos, levando-os à morte dentro de 24 h. As suas carcaças serviriam, então, como fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano (ANTUNES et al., 2015b).

É sabido que o processo infeccioso no trato urinário depende da capacidade de aderência e multiplicação bacteriana no epitélio desta região. Além disso, a formação de biofilme desempenha um papel importante no desenvolvimento destas infecções. Com base neste processo e a fim de investigar o potencial de *C. mycetoides* desencadear ITU, algumas

análises mais específicas foram realizadas. O isolado clínico foi testado quanto a sua capacidade de formação de biofilme e de interação com células eucarióticas renais.

A capacidade de aderência e formação de biofilme a diferentes superfícies tem sido estudada para algumas espécies de corinebactérias nos últimos anos. Para *C. diphtheriae*, a aderência a substratos, como vidro, poliestireno e poliuretano, parece estar envolvida no desenvolvimento do processo infeccioso desta espécie no hospedeiro humano, bem como na sua perpetuação no ambiente (GOMES et al., 2009; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; MATTOS-GUARALDI et al., 1999, 2000; MOREIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2015). Acredita-se que esta habilidade seja também um pré-requisito a patogênese de infecções humanas, associadas ou não ao uso de dispositivos médicos, por micro-organismos oportunistas, já que atributos que lhes permitam resistir a mecanismos de defesa do hospedeiro e a antimicrobianos são igualmente necessários (BONIFAIT et al., 2008; SOUZA et al., 2015a). Neste contexto, alguns estudos já foram realizados e a formação de biofilme descrita para as espécies: *C. pseudotuberculosis*, *C. renale*, *C. urealyticum*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum* e *C. striatum* (KWASZEWSKA et al. 2006; OLSON et al. 2002; SORIANO et al. 1993; 2009; SOUZA et al., 2015a,b).

Diferentemente do observado para a maior parte das corinebactérias estudadas, a amostra clínica de *C. mycetoides* isolada neste trabalho não foi capaz de aderir à superfície do vidro. Foi capaz de formar biofilme com fraca intensidade na superfície de poliestireno. Por outro lado, foi capaz de formar biofilme nas superfícies de dispositivos médicos utilizados rotineiramente no ambiente hospitalar, os cateteres de poliuretano, silicone e látex, o que evidencia o potencial patogênico desta espécie. Uma atenção deveria ser dada para esses últimos dados, uma vez que o silicone e o látex são materiais utilizados para a fabricação do cateter vesical, cujo procedimento é amplamente praticado na prática hospitalar para auxiliar no diagnóstico e no tratamento de diversos processos patológicos (LENZ, 2006).

As células Vero são consideradas uma boa representação do trato urinário, tendo sido utilizadas em estudos de virulência com cepas causadoras de infecções neste sítio (ANANIA; YANO, 2008; CORDEIRO et al., 2016; PEERBOOMS et al., 1984). Os ensaios de interação realizados no presente trabalho revelaram que *C. mycetoides* é capaz de aderir a este tipo celular. Além disso, bactérias foram encontradas viáveis no compartimento intracelular durante todo o ensaio. Estes resultados podem ser considerados mais um indício da patogenicidade desta espécie.

É preciso considerar infecções causadas por corinebactérias, principalmente quando as espécies isoladas forem incomuns e/ou raras de serem encontradas em determinados sítios,

devendo ser investigada a sua virulência e patogenicidade. Por último e não menos importante, com base em todo o exposto, não deveria ser pré-conceituado como contaminante isolados de corinebactérias ainda não reconhecidas como patógenos humanos, tanto de infecções urinárias quanto de outras infecções, principalmente em pacientes com múltiplas comorbidades. É preciso lembrar, por exemplo, que *Staphylococcus saprophyticus* que hoje está bem estabelecido como um predominante uropatógeno Gram-positivo, há tempos atrás foi originalmente considerado um contaminante do sítio urinário (KLINE et al., 2012).

CONCLUSÕES

- a) Ao todo 69 amostras de corinebactérias foram identificadas em urinoculturas de pacientes atendidos no HUPE/UERJ entre janeiro de 2011 e janeiro de 2013. Foram encontradas as espécies: *C. afermentans*, *C. propinquun*, *C. jeikeium*, *C. coyleae*, *C. urealyticum*, *C. glucuronolyticum* e aquelas pertencentes ao Complexo XSMA;
- b) Os indivíduos mais acometidos pelas ITU foram do sexo feminino, acompanhados ambulatorialmente pelos setores de Transplante e Nefrologia, e que tinham idade entre 40 e 61 anos;
- c) As amostras isoladas apresentaram perfis de sensibilidade aos antimicrobianos variados, sendo a maioria classificada como MDR. Foi observada maior resistência a nitrofurantoína e ao sulfametoxazol com trimetoprima;
- d) Esta é a primeira vez que foi relatada ITU por *C. mycetoides*;
- e) As análises da morfologia colonial e celular e do perfil fenotípico de *C. mycetoides* corroboraram às descritas previamente por outros autores que também isolaram esta espécie. Contudo, os esquemas utilizados para BGPI não permitiram a sua identificação no nível de espécie;
- f) Os diferentes métodos semi-automatizados utilizados para o diagnóstico da amostra de *C. mycetoides* também não foram capazes de identificar o micro-organismo no nível de espécie, apresentando resultados divergentes entre si;
- g) A identificação por MALDI-TOF e o sequenciamento dos genes conservados, 16S rRNA e *rpoB*, permitiram a identificação da amostra como *C. mycetoides*;
- h) *C. mycetoides* foi capaz de afetar a sobrevivência do nematódeo *C. elegans*, além de induzir o efeito *bagging* e a formação de *star* por estes animais, indícios do potencial patogênico deste micro-organismo;
- i) *C. mycetoides* foi incapaz de aderir à superfície de vidro. Entretanto, demonstrou a habilidade de formar biofilme nas superfícies de cateteres de poliuretano, silicone e látex, bem como na superfície de poliestireno;
- j) *C. mycetoides* revelou a capacidade de aderir e sobreviver no interior de células epiteliais renais.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (Brasil). Principais síndromes infecciosas. In: *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. 1ª ed. Brasília: Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. p. 1-8.
- AHMAD, N. M.; AHMAD, K. M. *Corynebacterium minutissimum* pyelonephritis with associated bacteraemia: a case report and review of literature. *Journal of Infection*, v. 51, n. 5, p. e299-303, 2005.
- ALATOOM, A. A. *et al.* Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 160–163, 2012.
- ALEXANDER, D. Splenic abscess caused by *Corynebacterium diphtheriae*. *Clinical Pediatrics*, v. 23, n. 10, p. 591-592, 1984.
- ALMEIDA, M. C.; SIMÕES, M. J. S.; RADDI, M. S. G. Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 2, p. 215-219, 2007.
- ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v. 41, n. 10, p. 877-883, 2008.
- ALTERI, C. J.; HIMPSL, S. D.; MOBLEY, H. L. Preferential use of central metabolism in vivo reveals a nutritional basis for polymicrobial infection. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 1, e1004601, 2015.
- APERIS, G.; MOYSSAKIS, I. *Corynebacterium minutissimum* endocarditis: a case report and review. *Journal of Infection*, v. 54, n. 2, p. e79-81, 2007.
- ARMBRUSTER, C. E. *et al.* Increased incidence of urolithiasis and bacteremia during *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* coinfection due to synergistic induction of urease activity. *Journal of Infection Diseases*, v. 209, n. 10, p. 1524–1532, 2014.
- AUDARD, V. *et al.* Fatal septic shock caused by *Corynebacterium D2*. *Intensive Care Medicine*, v. 29, n. 8, p. 1376-1379, 2003.
- BABEY, H. A.; KAMBAL, A. M. Isolation of coryneform bacteria from blood cultures of patients at a university hospital in Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal*, v. 25; n. 8, p.1073-1079, 2004.

BAIO, P. V. P. *et al.* Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment. Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 1, p. 23-29, 2013.

BALCI, I.; EKSI, F.; BAYRAM, A. Coryneform bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibilities. *Journal of International Medical Research*, v. 30, n. 4, p. 422-427, 2002.

BAYRAK, O. *et al.* Is single-dose fosfomycin trometamol a good alternative for asymptomatic bacteriuria in the second trimester of pregnancy? *International Urogynecology Journal*, v. 18, n. 5, p. 525-529, 2007.

BECHARA, C. *et al.* *Corynebacterium jeikeium* pacemaker infection associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies: a single positive blood culture could be sufficient for diagnosis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 249-251, 2011.

BELMARES, J. *et al.* *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infectious Disease* v. 7, n. 4, p. 1-8, 2007.

BERNARD, K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 10, p. 3152–3158, 2012.

BISHARA, J. *et al.* Five-year prospective study of bacteraemic urinary tract infection in a single institution. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases*, v. 16, n. 8, p. 563–567, 1997.

BONIFAIT, L.; GRIGNON, L.; GRENIER, D. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 74, n. 15, p. 4969–4972, 2008.

BONMARIN, I. *et al.* Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*, v. 27, n. 31, p. 4196-4200, 2009.

BRAUN, M. S. *et al.* *Corynebacterium uropygiale* sp. nov., isolated from the preen gland of Turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Systematic and Applied Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 88-92, 2016.

BROADWAY, M. M. *et al.* Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 16, p. 3774-3783, 2013.

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

CATTANI, S. *et al.* Sepsis caused by *Corynebacterium xerosis* in neonatology: report of a clinical case. *Acta Biomedica Ateneo Parmense*, v. 71, p. 777-780, 2000. Suplemento n. 1.

CAVENDISH, J.; COLE, J. B.; OHL, C. A. Polymicrobial central venous catheter sepsis involving a multiantibiotic-resistant strain of *Corynebacterium minutissimum*. *Clinical Infectious Disease*, v. 19, n. 1, p. 204-205, 1994.

CHAO, C. T.; HUANG, J. W.; YEN, C. J. A rare and under-recognized pathogen in peritoneal dialysis peritonitis: *Corynebacterium jeikeium*. *Peritoneal Dialysis International*, v. 33, n. 5, p. 580-581, 2013.

CHEN, H. H. *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 779-782, 2004.

CHEN, X. *et al.* *Corynebacterium faecale* sp. nov., isolated from the faeces of Assamese macaque. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 7, p. 2478-2483, 2016.

CHOE, H. S. *et al.* Analysis of the distribution of bacteria within urinary catheter biofilms using four different molecular techniques. *American Journal of Infection Control*, v. 40, n. 9, p.e 249-254, 2012.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, v. 37, n. 1, p. 318–326, 1982.

CLARKE, R. *et al.* Septic arthritis caused by *Corynebacterium amycolatum* following vascular graft sepsis. *Journal of Infection*, v. 38, n. 2, p. 126-127, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*: CLSI document M100-S20. 20TH Informational Supplement. Wayne, PA. 2011.

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

COLLINS, M. D. *et al.* *Corynebacterium testudinoris* sp. nov., from a tortoise, and *Corynebacterium felinum* sp. nov., from a Scottish wild cat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 1349-1352, 2001.

CORDEIRO, M. A. *et al.* Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 414–416, 2016.

COYLE, M. B.; LIPSKY, B. A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n. 3, p. 227-246, 1990.

DALAL, A.; URBAN, C.; SEGAL-MAURER, S. Endocarditis due to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, p. 1299-1302, 2008.

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

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN (DSMZ). Disponível em :

<http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genus=Corynebacterium> Acesso em: 11 mar. 2014.

DEVRIESE, L. A. *et al.* Identification of *Corynebacterium glucoronolyticum* strains from the urogenital tract of humans and pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 12, p. 4657-4659, 2000.

DIAS, A. A. S. O. *et al.* *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de Saúde Pública*, v. 45, n. 6, p. 1-15, 2011.

DIAS, M. *et al.* *Corynebacterium macginleyi* a rare bacteria causing infection in an immunocompromised patient. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 6, n. 3, p. 374-375, 2010.

DOBLER, G.; BRAVENY, I. Highly resistant *Corynebacterium macginleyi* as cause of intravenous cateter-related infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, v. 22, n. 1, p. 72-73, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. *Clinical Microbiology Review*, v. 15, n.2, p. 167-193, 2002.

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

ESTEBAN, J. *et al.* Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 18, p. 518-521, 1999.

FALAGAS, M. E. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomicin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 5, p. 497-499, 2010.

FARAJ, S.; FRENCH, J. G.; MCAUSLAN, A. Septic arthritis due to a toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* *gravis*. *New Zealand Medical Journal*, v. 116, n. 1172, p. 404, 2003.

FERNÁNDEZ-AYALA, M.; NAN, D. N.; FARIÑAS, M. C. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. *American Journal of Medicine*, v. 111, n. 2, p. 167, 2001.

FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. *et al.* *Corynebacterium ciconiae* sp. nov., isolated from the trachea of black storks (*Ciconia nigra*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 2191-2195, 2004.

FERNÁNDEZ-GIRÓN, F. *et al.* *Corynebacterium minutissimum* peritonitis in a CAPD patient. *Peritoneal Dialysis International*, v. 18, n. 3, p. 345-346, 1998.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L. *et al.* *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial drug-resistant endocardial pathogen. *The Journal of Heart Valve Disease*, v. 22, n. 3, p. 428-430, 2013.

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

FERRER, I. *et al.* Infección urinaria por *Corynebacterium riegelii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 19, n. 6, p. 284-285, 2001.

FEURER, C. *et al.* Taxonomic characterization of nine strains isolated from clinical and environmental specimens, and proposal of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 4, p. 1055-1061, 2004.

FORMIGA, L. C. D.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Diphtheria: current status and laboratory procedures for diagnosis. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, v. 29, p. 93-96, 1993.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews: Urology*, v. 7, n. 12, p. 653-660, 2010.

FOXMAN, B; BROWN, P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 17, n. 2, p. 227-241, 2003.

FUDOU, R. *et al.* *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 52, n. 4, p. 1127-1131, 2002.

FUNKE, G.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D. Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, n.4, p. 735-739, 1995.

_____. *Corynebacterium mucifaciens* sp. nov., an unusual species from human clinical material. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, n. 4, p. 952-957, 1997.

_____. *Corynebacterium riegelii* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 624-627, 1998.

FUNKE, G. *et al.* Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p. 1124-1128, 1996.

GALAN-SANCHEZ, F. *et al.* Urethritis due to *Corynebacterium glucuronolyticum*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 17, n. 5, p. 720-721, 2011.

GALAZKA, A. M.; ROBERTSON, S. E.; OBLAPENKO, G. P. Resurgence of diphtheria. *European Journal of Epidemiology*, v. 11, n. 1, p. 95-105, 1995.

GONZÁLEZ-CHAMORRO F. *et al.* Urinary tract infections and their prevention. *Actas Urológicas Españolas*, v. 36, n. 1, p. 48-53, 2012.

GOMES, D. L. R. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n.11, p. 1419-1427, 2009.

GUARDERA, J. *et al.* *Corynebacterium minutissimum* bacteremia in a patient with chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 5, n. 4, p. 327-330, 1986.

GUIMARÃES, L. C. *et al.* Complete Genome Sequence of *Corynebacterium urealyticum* Strain DSM 7111, Isolated from a 9-Year-Old Patient with Alkaline-Encrusted Cystitis. *Genome Announcements*, v. 1, n. 3, pii: e00264-13, 2013.

GUPTA, K.; SCHOLLES, D.; STAMM, W. E. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, v. 281, n. 8, p. 736-738, 1999.

GUPTA K. *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in woman: a 2010 update by the infectious diseases society of America and the European society for microbiology and infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 5, p. e103-120, 2011.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Diagnosis and clinical management of urinary tract infection. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 49, n. 1, p. 109-116, 2003.

HERSCHORN, B. J.; BRUCKER, A. J. Embolic retinopathy due to *Corynebacterium minutissimum* endocarditis. *The British Journal of Ophthalmology*, v. 69, n. 1, p. 29-31, 1985.

HERTIG, A. Encrusted pyelitis of native kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 11, n. 6, p. 1138-1140, 2000.

HIRATA JR, R. *et al.* Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, n. 11, p. 986-91, 2008.

HJELM, E.; LUNDELL-ETHERDEN, I.; MARDH, P. A. Ascending urinary tract infections in rats induced by *Staphylococcus saprophyticus* and *Proteus mirabilis*. *Acta Pathologica, Microbiologica, Immunologica Scandinavica*, v. 95, n. 6, p. 347-350, 1987.

HODGKIN, J. *et al.* Two *Leucobacter* strains exert complementary virulence on *Caenorhabditis* including death by worm-star formation. *Current Biology*, v. 23, n. 21, p. 2157-2161, 2013.

HOOTON, T. M. Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 366, n. 11, p. 1028–1037, 2012

HOOTON, T.M. *et al.* A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. *The New England of Medicine*, v. 343, n. 14, p. 992-997, 2000.

HORVATH JR, D. J. *et al.* New paradigms of urinary tract infections: implications for patient management. *Indian Journal of Urology*, v. 28, n. 2, p.154-158, 2012.

JANDA, W. M. The *Corynebacteria* revisited: new species, identification kits, and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Newsletter*, v. 21, p. 175-180, 1999.

JOHANSEN, T. E. B. *et al.* Hospital acquired urinary tract infections in urology departments: pathogens, susceptibility and use of antibiotics data from the PEP and PEAP-studies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 28, p. 91-107, 2006. Suplemento.

JORGENSEN, I; SEED, P. C. How to make it in the urinary tract: a tutorial by *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 10, e1002901, 2012.

JOHNSON, A.; HUSE, P.; OPPENHEIM, B. A. *Corynebacterium jeikeium* meningitis and transverse myelitis in a neutropenic patient. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 11, n. 5, p. 473-474, 1992.

JOHNSON, M. H.; STROPE, S. A. Encrusted cystitis. *Urology*, v. 79, n. 3, p. e31-32, 2012.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 3925-3931, 2004.

_____. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 4, p.1934–1936, 2005.

KLINE, K. A. *et al.* Immune modulation by group B *Streptococcus* influences host susceptibility to urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 12, p. 4186–4194, 2012.

_____. Impact of host age and parity on susceptibility to severe urinary tract infection in a murine model. *PLoS One*, v. 9, n. 5, e97798, 2014.

KNOX, K. L.; HOLMES, A. H. Nosocomial Endocarditis Caused by *Corynebacterium amycolatum* and Other Nondiphtheriae Corynebacteria. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 1, 2002.

KONEMAM *et al.* Aerobic and facultative Gram-positive bacilli. In:_____. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams e Wilkins, 2006. p. 783-810.

KONINGSTEIN, M. *et al.* Recommendations for the empirical treatment of complicated urinary tract infections using surveillance data on antimicrobial resistance in the Netherlands. *PLoS One*, v. 9, n. 1, e86634, 2014.

KONRAD, R. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro Surveillance*, v. 15, n. 43, p. 19699, 2010.

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

KWASZEWSKA, A. K.; BREWCZYNSKA, A.; SZEWCZYK, E. M. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin corynebacteria. *Polish Journal of Microbiology*, v. 55, n. 3, p. 189–193, 2006.

LENZ, L. L. Cateterismo vesical: cuidados, complicações e medidas preventivas. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v. 35, n. 1, p. 82-91, 2006.

LIETEN, S. *et al.* Alkaline-encrusted pyelitis and cystitis: an easily missed and life-threatening urinary infection. *BMJ Case Report*, p. 1-3, 2011.

LÓPEZ, A. B. *et al.* Cistitis y hematuria por *Corynebacterium striatum*. A propósito de un caso y revisión de la literatura científica. *Actas Urológicas Españolas*, v. 33, n. 8, p. 909-912, 2009.

MAHESWARI, U. B. *et al.* Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Indian Journal of Urology*, v. 29, n. 4, p. 277-281, 2013.

MAKI, D. G.; WEISE, C. E.; SARAFIN, H. W. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 296, p.1305-1309, 1977.

MANZELLA, J. P., KELLOGG, J. A.; PARSEY, K. S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. *Clinical Infectious Disease*, v. 20, n. 1, p. 37-40, 1995.

- MARRIE, T. J.; COSTERTON, J. W. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intra-arterial catheters. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 19, n. 5, p. 687–693, 1984.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L., ORTEGA, M. C., SUARÉZ, A.I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 5, p. 1318-1321, 1995.
- MARULL, J.; CASARES, P. A. Nosocomial valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: a case report. *Cases Journal*, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2008.
- MATTOS-GUARALDI, A. L; FORMIGA, L. C. D. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, n. 4, p. 399-406, 1991.
- MATTOS-GUARALDI, A. L. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 33, p. 99-100, 2001.
- MARTI, J.; ANTON, E.; IDOATE, A. Implantable cardioverter-defibrillator infection due to *Corynebacterium xerosis*. *International Journal of Cardiology*, v. 128, n. 1, p. e1-2, 2008.
- MARTINS, C. *et al.* Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 6, p. 905-913, 2009.
- MENON, T.; SENTHILKUMAR, S.; PACHAIYAPPAN, P. Native valve endocarditis caused by a non-toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae*. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 899-900, 2010.
- MERHEJ, V. *et al.* *Corynebacterium timonense* sp. nov. and *Corynebacterium massiliense* sp. nov., isolated from human blood and human articular hip fluid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 8, p. 1953-1959, 2009.
- MIGUEL, I.; RODRÍGUEZ, E.; MARTÍN, A. M. *Corynebacterium amycolatum*: sepsis in hematologic patients. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 17, n. 7, p. 340-341, 1999.
- MIGUEL-MARTINEZ, I. *et al.* Sepsis due to multiply resistant *Corynebacterium amycolatum*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 15, p. 617–618, 1996.
- MINKIN, R.; SHAPIRO, J. M. *Corynebacterium afermentans* lung abscess and empyema in a patient with human immunodeficiency virus infection. *Southern Medical Journal*, v. 97, n. 4, p. 395-397, 2004.
- MOBLEY, H. L.; WARREN, J. QW. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, n. 11, p. 2216–2217, 1987.

- MOOKADAM, F. *et al.* *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: a systemic overview spanning four decades. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 25, n. 6, p. 349–353, 2006.
- MOREIRA, L. O. *et al.* Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 10, p. 5907-5913, 2003.
- MORRIS, A.; GUILD, I. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains. *Reviews of Infectious Disease*, v. 13, n. 5, p. 887-892, 1991.
- MOSSER, T.; MATIC, L.; LEROY, M. Bacterium-induced internal egg hatching frequency is predictive of life span in *Caenorhabditis elegans* populations. *Applied Environmental Microbiology*, v. 77, n. 22, p. 8189–8192, 2011.
- MUNGELLUZZI, C.; CAPRILLI, F. *Corynebacterium mycetoides*, (Castellani) Orтали and Capocaccia, 1956. Etiologic agent of tropical ulcer. *Archivio Italiano di Scienze Mediche Tropicali e di Parassitologia*, v. 46, n. 7, p. 301-304, 1965.
- MUNIAN, M. A. *et al.* *Corynebacterium jeikeium* osteomyelitis successfully treated with teicoplanin. *The Journal of Infection*, v. 35, n. 3, p. 325-326, 1997.
- MURRAY, P. R. Coryneform Gram-positive rods. In: _____. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, USA: Ed. American Society for Microbiology Press, p. 485-514, 2007.
- MUTTAIYAH, S. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: a case series and review of the treatment approach. *International Journal of Infectious Disease*, v. 15, n. 9, p. e584-588, 2011.
- NICOLLE, L. E. A practical guide to antimicrobial management of complicated urinary tract infection. *Drugs and Aging*, v. 18, n. 4, p. 243-254, 2001.
- NICOLLE, L. E. *et al.* Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clinical Infectious Diseases*, v. 40, n. 5, p. 643-654, 2005.
- NOVO-VELEIRO, I. *et al.* Paucisymptomatic infectious prostatitis as a cause of fever without an apparent origin. A series of 19 patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 263-268, 2013.

OLENDER, A.; LETOWSKA, I. Wound infections due to opportunistic corynebacterium species. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, v. 62, n. 2, p. 135-140, 2010.

OLIVA, A. *et al.* Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 12, p. 4669-4671, 2010.

OLSON, M. E. *et al.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 66, n. 2, p. 86-92, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Diphtheria*. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/diphtheria/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

ORDÓÑEZ-PALAU, S.; BOQUET, D. Chronic osteomyelitis of the metatarsal sesamoid due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient with rheumatoid arthritis. *Join Bone Spine*, v. 74, n. 5, p. 509-517, 2007.

OTEO, J. *et al.* Significant bacteremias by *Corynebacterium amycolatum*: an emergent pathogen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 19, n. 3, p. 103-106, 2001.

OTSUKA, Y. *et al.* Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 54, n. 2, p. 109-114, 2006.

OTT, L. *et al.* Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. *FEMS Immunology and medical Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 413-421, 2012.

PALLET, A.; HAND, K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 25-33, 2010. Suplemento 3.

PEERBOOMS, P. G.; VERWEIJ, A. M.; MACÇAREN, D. M. Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*, v. 43, n. 3, p. 1068-1071, 1984.

PEREIRA, G. A. *et al.* Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p. 507-510, 2008.

PESSANHA, B. *et al.* Infectious endocarditis due to *Corynebacterium xerosis*. *Cardiovascular Pathology*, v. 12, n. 2, p. 98-101, 2003.

PRETE, D. D. *et al.* Encrusted cystitis by *Corynebacterium urealyticum*: a case report with novel insights into bladder lesions. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 23, n.8, p. 2685-2687, 2008.

POILANE, I. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* osteomyelitis in an immunocompetent child: a case report. *European Journal of Pediatrics*, v. 154, n. 5, p. 381-383, 1995.

- PORSCHEN, R. K.; GOODMAN, Z.; RAFAI, B. Isolation of *Corynebacterium xerosis* from clinical specimens. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 68, p. 290-293, 1977.
- RAZ, R.; COLODNER, R.; KUNIN, C.M. Who are you--Staphylococcus saprophyticus? *Clinical Infection Disease*, v. 40, n. 6, p. 896-898, 2005.
- RENAUD, F. N. *et al.* Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 12, p. 3698-3702, 1998.
- RENON, F. *et al.* Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 2064-2067, 2007.
- RIDDLE, D. L. *et al.* *C. elegans* II. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1997.
- RIEGEL, P. *et al.* Taxonomic study of *Corynebacterium* Group ANF-1 strains: Proposal of *Corynebacterium afermentans* sp. nov. containing the subspecies *C. afermentans* subsp. *afermentans* subsp. nov. and *C. afermentans* subsp. *lipophilum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 287-292, 1993.
- RIEGEL, P. *et al.* Isolation of *Corynebacterium tuscaniae* sp. nov. from blood cultures of a patient with endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 307-312, 2006.
- RIEGEL, G. *et al.* Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 15, p. 657-662, 1996.
- RODRIGUES, T. M. *et al.* Como diagnosticar e tratar infecção urinária. *Equilíbrio e Vida*, v. 67, p. 100-109, 2010.
- ROZDZINSKI, E. *et al.* *Corynebacterium jeikeium* bacteremia at a tertiary care center. *Infection*, v. 19, n. 4, p. 201-204, 1991.
- ROUSSEAU, M. C.; SIMHA, V.; DOYARD, P. A. *Corynebacterium glucuronolyticum* lower urinary tract infection. *Presse Médicale*, v. 28, n. 35, p. 1938-1939, 1999.
- RUPP, M. E. *et al.* Central venous catheter-related *Corynebacterium minutissimum* bacteremia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 19, n. 10, p. 786-789, 1998.

SATO, K.; UCHIYAMA, M. *Corynebacterium jeikeium* bacteraemia and pulmonary infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. *BMJ Cases Reports*, pii: bcr1120115097, 2012.

SAVINI, V. *et al.* About a bloodstream *Corynebacterium striatum* isolate. *Folia Microbiologica*, v. 58, n. 6, p. 451–453, 2013.

SHUMAN, E. K.; CHENOWETH, C. E. Recognition and prevention of healthcare-associated urinary tract infections in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, v. 38, n. 8, p. 373–379, 2010. Suplemento.

SCOLLE, D. A spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 656–658, 2007.

SCOTTISH INTERCOLLEGIATE GUIDELINES NETWORK (SIGN). *Management of suspected bacterial urinary tract infection in adults*. Edinburgh: Ed. SIGN, 2012.

SHARMA, A. M.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.

SIEGMAN-IGRA, Y. *et al.* The significance of polymicrobial growth in urine: contamination or true infection. *Scandinavian Journal of Infection Diseases*, v. 25, n. 1, p. 85–91, 1993.

SIFRI, C. D.; BEGUN, J.; AUSUBEL, F. M. The worm has turned-- microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 119–27, 2005.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. *Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 4 v. v. 3, p. 1386–1443, 2005.

SORIANO, F. *et al.* Skin colonization by *Corynebacterium* groups D2 and JK in hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, n. 9, p. 1878–1880, 1988.

SORIANO, F.; PONTE, C.; GALIANO, M. J. Adherence of *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2) and *Corynebacterium jeikeium* to intravascular and urinary catheters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 12, n. 6, p. 453–456, 1993.

SORIANO, F.; TAUCH, A. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium urealyticum*: urinary tract stones and genomics as the Rosetta Stone. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 14, n. 7, p. 623–643, 2008.

SORIANO, F. *et al.* *In vitro* activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, n. 2, p. 353–356, 2009.

- SOUZA, C. *et al.* Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 2, p. 242–248, 2015.
- SOUZA, M. C. *et al.* Biofilm formation and fibrinogen and fibronectin binding activities by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* invasive strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 107, n. 6, p. 1387-1399, 2015.
- STEPANOVIC S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- SUPPERT, S. V. *et al.* *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, n. 2, p. 115-116, 2009.
- TEJEDOR, M. T. *et al.* Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 41, n. 2, p. 126-127, 2000.
- THEEL, E. S. *et al.* Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and *Corynebacterium* Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 3093-3095, 2012.
- TIWARI, T. S. *et al.* Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 3, p. 395-401, 2008.
- TORRES, A. P. Coagulase-negative strains of staphylococcus possessing antigen 51 as agents of urinary infection. *Journal of Clinical Pathology*, v. 15, n. 3, p. 252–253, 1962.
- TSUCHIMORI, N. *et al.* *Enterococcus faecalis* aggravates pyelonephritis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in experimental ascending mixed urinary tract infection in mice. *Infection Immunity*, v. 62, n. 10, p. 4534–4541, 1994.
- VAN DAM, A. P. *et al.* A case of diphtheria in the Netherlands due to an infection with *Corynebacterium ulcerans*. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, v. 147, n. 9, p. 403-406, 2003.
- VEDEL, G. *et al.* *Corynebacterium pseudogenitalium* urinary tract infection. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 2, p. 355-356, 2006.
- VELA, A. I. *et al.* *Corynebacterium suicordis* sp. nov., from pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 6, p. 2027-2031, 2003.
- VERDAGUER, R. *et al.* Infección del tracto urinario causada por *Corynebacterium riegelli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 26, n. 10, p. 669-673, 2008.

VERROKEN, A. *et al.* Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 1, p. 44-50, 2014.

VILA, J. *et al.* Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 5, p. 1745–1747, 2012.

VILLANUEVA, J. L. *et al.* *Corynebacterium macginleyi* isolated from urine in a patient with a permanent bladder catheter. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 34, n. 9, p. 699-700, 2002.

WAGNER, K. S. *et al.* Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiology & Infection*, v. 138, n. 11, p. 1519-1530, 2010.

WANG, C. C.; MATTSON, D.; WALD, A. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters. *Bone Marrow Transplantation*, v. 27, n. 4, p. 445-449, 2001.

WARREN, J. V. *et al.* Guidelines for the treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, n. 4, p. 745-58, 1990.

WATTS, J. L. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 10, p. 2373-2379, 2000.

WAUTERS, G. *et al.* Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 1430-1432, 1998.

WEISS, K.; LABBÉ, A. C.; LAVERDIÈRE, M. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clinical Infectious Disease*, v. 23, n. 6, p. 1246-1248, 1996.

WONG, K. Y.; CHAN, Y. C.; WONG, C. Y. *Corynebacterium striatum* as emerging pathogen. *Journal of Hospital Infection*, v. 76, n. 4, p. 371-372, 2010.

WOODS, T. D.; WATANAKUNAKORN, C. Bacteremia due to *Providencia stuartii*: review of 49 episodes. *Southern Medical Journal*, v. 89, n. 2, p. 221–224, 1996.

WOOSTER, S. L. *et al.* Brain abscess due to *Corynebacterium xerosis*. *Journal of Infection*, v. 38, n. 1, p. 55-56, 1999.

YASSIN, A. F. *Corynebacterium ureicelerivorans* sp. nov., a lipophilic bacterium isolated from blood culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 6, p. 1200-1203, 2007.

YOON, S. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in gyrA gene that confers high-level quinolone resistance. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, v. 31, p. 47-48, 2011.

ZIMMERMANN, J. *et al.* *Corynebacterium crudilactis* sp. nov., a new *Corynebacterium* species isolated from raw cow's milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016.

APÊNDICE A – Produção científica durante o período probatório



Research Article

Open Access

Trimethoprim-sulfamethoxazole and fluoroquinolones Resistant *Escherichia Coli* in Community-Acquired and Nosocomial Urinary Tract Infections in Rio De Janeiro, Brazil

Julio César Delgado Correal¹, Lincoln de Oliveira Sant'Anna², Ana Fátima Coelho Carvalho¹, Claudia Patricia Alburquerque de Carvalho Seraphim³, Gustavo Braga Mendes¹, Gabriela Higino de Souza¹, Suzimar da Silveira Rioja², Eduardo de Almeida Ribeiro Castro¹, Raphael Hirata Jr², Ana Cláudia de Paula Rosa², Ana Luiza Mattos-Guaraldi^{2*}, José Augusto Adler Pereira² and Paulo Vieira Damasco^{1,4,4}

¹State University of Rio de Janeiro, Medical Science Department, Brazil

²State University of Rio de Janeiro, Microbiology Department, Brazil

³Federal University of the State of Rio de Janeiro, Medicine School, UNIRIO, Brazil

⁴Pedro Ernesto University Hospital, Infection Control Committee, Brazil

Abstract

To investigate the multidrug resistance (MDR) patterns of *Escherichia coli* causative of urinary tract infections (UTI) in patients attending a tertiary university hospital of Rio de Janeiro, Brazil. Antibiotic susceptibility testing was performed by the disk diffusion method. MDR, extensively-resistance (XDR) and pan-resistance (PDR) were defined by using recently described criteria. Retrospective analyses of clinical, microbiological and demographic features of outpatients and inpatients with UTI (n=416) were also performed. High antibiotic resistance rates for trimethoprim-sulfamethoxazole - SXT-TMP (n=177; 46.7%) and fluoroquinolones - FQ [n=117; norfloxacin (27%) and ciprofloxacin (26.8%) - (FQ) were demonstrated for *E. coli* strains isolated from community and healthcare-onsets. Risk factors associated with UTIs due to MDR *E. coli* isolates included prior three-month hospitalization (OR: 2.4; CI 95%: 1.3-4.4; p<0.005), presence of neurogenic bladder (OR: 3.7; CI 95%: 1.7-8.3; p<0.01) and kidney transplantation (OR: 3.1; CI 95%: 1.0-5; p<0.04). A high prevalence of community-acquired and nosocomial urinary tract infections due SXT-TMP/FQ resistant *E. coli* strains was observed in Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. According to IDSA Guidelines, initial empirical therapy for community-associated UTI with SXT-TMP and FQ should be avoided in Rio de Janeiro. Nitrofurantoin, amoxicillin/clavulanic, piperacillin/tazobactam or gentamicin associations were effective for the empiric therapy for community-acquired and healthcare-associated UTIs, respectively.

Keywords: *Escherichia coli*; Healthcare-associated infections; Kidney transplantation trimethoprim-sulfamethoxazole resistance; Fluoroquinolones resistance; Urinary tract infection

Introduction

Urinary tract infection (UTI) is one of the most important causes of healthcare-associated infections in many clinical onsets worldwide, including Brazil [1,2]. UTI brings considerable risk on morbidity and mortality to patients, especially in catheter associated urinary tract infections (CAUTI) which prolonged the length of stay in intensive care units (ICU) and increased the risk of death [3]. Several epidemiological studies have shown increasing trends on multidrug resistant (MDR) *Escherichia coli* in UTI and bloodstream infections within the community as well as in hospitals and long-term care facilities [4-10]. Nowadays, the emergence of antimicrobial resistance among uropathogenic *E. coli* is one of the most impacting factors in UTI management. Recent published guidelines for the management of uncomplicated UTI [11] and CAUTI [12] have several limitations on antibiotic choices related to the regional epidemiologic variations of *E. coli* drug resistance. Therefore, periodically surveillance of antibiotic resistance patterns is a strategic tool to guide empiric antibiotic therapy in UTI, especially of patients presenting structural disturbs of urinary tract and/or submitted to prior hospitalization or kidney transplantation.

The aims of this study were to characterize the antibiotic susceptibility profiles of *E. coli* isolates recovered from community and healthcare-associated UTIs and to correlate these findings with risk factors and clinical features of patients attending a tertiary teaching 600-beds hospital in Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil.

Methodology

Microbiological, clinical and demographic characteristics of patients with UTI

Urine cultures records from outpatients and inpatients (n=419) with *E. coli* growth in a recount higher than 10⁵ colony-forming unit (CFU) (n=437) were retrospectively analyzed. Bacterial isolation and identification procedures were performed following institutional protocols and using biochemical tests described elsewhere [13]. Definition of community and healthcare-associated *E. coli* infection was based on the classification of the Centers for Disease Control and Prevention-CDC (USA) [14]. Community-associated *E. coli* isolates were considered when recovered from patients with 48 hours or less of hospitalization. Only one positive-culture by patient during a three-month period was selected for this survey. Urine samples presenting

*Corresponding author: Ana Luiza de Mattos Guaraldi, 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 - UERJ - Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, RJ, Brazil, CEP: 20 551-030, Tel: +55(21) 2868-8280; Fax: +55(21) 2868-8376, E-mail: aguaraldi@gmail.com

Received October 04, 2014; Accepted November 28, 2014; Published December 07, 2014

Citation: Correal JCD, Sant'Anna LO, Carvalho AFC, Seraphim CPAC, Mendes GB, et al. (2014) Trimethoprim-sulfamethoxazole and fluoroquinolones Resistant *Escherichia Coli* in Community-Acquired and Nosocomial Urinary Tract Infections in Rio De Janeiro, Brazil. J Infect Dis Ther 2: 192. doi:10.4172/2332-0877.1000192

Copyright: © 2014 Correal JCD, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

Paulo Victor Pereira Baio^{1,4,5}, Higor Franceschi Mota¹, Andréa D'ávila 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 Corinebactérias 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 *tpoB* 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 immunocompromise 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, PAPES V-FIOCRUZ/ CNPq, SR-2/UERJ, PNPD-CAPES/MEC, PAPP-FAPERJ/CAPES PVPB and HFM contributed equally to this work.

+ Corresponding author: guaraldi@uerj.br

Received 13 February 2012

Accepted 2 October 2012

APÊNDICE B – Produção científica durante o período do mestrado



Epidemiol. Infect. (2015), **143**, 791–798. © Cambridge University Press 2014
doi:10.1017/S0950268814001241

Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects

L. S. SANTOS¹, L. O. SANT'ANNA¹, J. N. RAMOS^{1,2}, E. M. LADEIRA²,
R. STAVRAKAKIS-PEIXOTO^{1,3}, L. L. G. BORGES⁴, C. S. SANTOS¹,
F. NAPOLEÃO¹, T. C. F. CAMELLO¹, G. A. PEREIRA^{1,5}, R. HIRATA JR.¹,
V. V. VIEIRA^{2,6}, L. M. S. S. COSME⁷, P. S. SABBADINI^{1,4}
AND A. L. MATTOS-GUARALDI^{1*}

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

² *National Institute of Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

³ *Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro - IMPPG/UF RJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

⁴ *Laboratory of Bacterial Respiratory and Systemic Diseases, Ceuma University – UNICEUMA, São Luís, MA – Brazil*

⁵ *General Coordination of Public Health Laboratories, Secretariat of Health Surveillance, Ministry of Health – CGLAB/SVS/MS, Brazil*

⁶ *Laboratory of Genetics of Microorganisms, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

⁷ *Central Laboratory of Public Health, Oswaldo Cruz Institute – LACEN, São Luís, MA, Brazil*

Received 24 September 2013; Final revision 23 April 2014; Accepted 24 April 2014;
first published online 22 May 2014

SUMMARY

We describe microbiological, clinical and epidemiological aspects of a diphtheria outbreak that occurred in Maranhão, Brazil. The majority of the 27 confirmed cases occurred in partially ($n=16$) or completely ($n=10$) immunized children ($n=26$). Clinical signs and characteristic symptoms of diphtheria such as cervical lymphadenopathy and pseudomembrane formation were absent in 48% and 7% of the cases, respectively. Complications such as paralysis of lower limbs were observed. Three cases resulted in death, two of them in completely immunized children. Microbiological analysis identified the isolates as *Corynebacterium diphtheriae* biovar *intermedius* with a predominant PFGE type. Most of them were toxigenic and some showed a decrease in penicillin G susceptibility. In conclusion, diphtheria remains endemic in Brazil. Health professionals need to be aware of the possibility of atypical cases of *C. diphtheriae* infection, including pharyngitis without pseudomembrane formation.

Key words: Brazil, *Corynebacterium diphtheriae* biovar *intermedius*, diphtheria outbreak.

INTRODUCTION

Corynebacterium diphtheriae is the main causative agent of diphtheria, a toxemic disease whose

prevention depends on the implementation of effective immunization programmes by using diphtheria toxoid (dT) vaccines [1]. Toxigenic *C. diphtheriae*

* Author for correspondence: Prof. Dr. A. L. Mattos-Guaraldi, 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. (Email: guaraldi@uerj.br)

may circulate in a community for 20 years after a reported case of diphtheria, even in countries where immunization programmes are followed with great efficiency [2, 3]. The introduction of toxigenic strains in a susceptible population may result in diphtheria outbreaks. All these aspects emphasize the need of vaccination strategies directed at persons of all ages and different ethnic groups and continuous surveillance of a population's immunity and new diphtheria cases [4]. Despite all relevant knowledge acquired in different areas (microbiology, pathology, internal and preventive medicine) during the years, eradication of *C. diphtheriae* has not yet been achieved [5].

Diphtheria causes significant illness and death in developing countries where vaccination coverage is low. Higher risk of acquiring the disease and potentially life-threatening complications are possible in inadequately immunized or unimmunized travellers to countries with endemic diphtheria [6, 7].

More recently in the Americas, diphtheria outbreaks have occurred in Haiti and the Dominican Republic. Diphtheria is rare in the USA; the last case occurred in an elderly traveller returning from Haiti in 2003. Although diphtheria is uncommon in industrialized countries because of longstanding routine use of vaccines containing dT [8], a changing epidemiology has been observed: *Corynebacterium ulcerans* has emerged as an important diphtheria toxin-producing pathogen and in some countries the number of diphtheria cases due to this species exceed the number reported with the classical aetiological agent, *C. diphtheriae*. Despite this, its capacity to cause disease in humans, including the inhabitants of urban centres, is still often neglected [9].

In Brazil, a developing country presenting a very large territory (8 547 403.5 km²) with varied geographical, social and economic conditions unfavourable for prevention of infectious diseases, during the last decades cases of diphtheria have been notified in many states, including in Maranhão, a northern state [6, 9–11]. Recently, one case of co-infection by *C. diphtheriae* and the infectious mononucleosis virus was also reported in a Brazilian 11-year-old child whose vaccination against diphtheria was incomplete [12]. It is important to mention that accurate data have not been available, particularly from the north, northern and central-west states, because reporting is infrequent, laboratory confirmation is not available, and the extent of carriers is not clearly known [6].

In view of these facts and considering that the vaccine does not affect the infection/colonization by

C. diphtheriae, since it is only directed against the toxin, not the whole bacterium, the endemicity of the disease in Brazil motivates diagnostic procedures appropriate to the environment, i.e. epidemiological and molecular investigations of the microorganism. The aim of the present investigation was to describe microbiological, clinical and epidemiological aspects of a diphtheria outbreak that recently occurred in Maranhão, Brazil.

METHODS

Clinical and epidemiological features

Data provided by the Public Health Secretary of the state of Maranhão showed that from January to June 2010, suspect diphtheria cases ($n=57$) and contacts of diphtheria patients ($n=117$) were notified in different villages of three municipalities of Maranhão: Jatobá ($n=95$), Colinas ($n=46$) and São Domingos ($n=33$).

Diphtheria cases were confirmed by laboratory, clinical or clinical-epidemiological criteria, according to the recommendations laid out in the Epidemiological Surveillance Guide of the Brazilian Health Ministry [13].

Origin of diphtheria bacilli strains, culture conditions and phenotypic analysis

Microorganisms were isolated from clinical samples collected with swabs from the nasopharynx and throat of the individuals at the Central Laboratory of Public Health from the state of Maranhão (LACEN-MA) by methods described previously [14]. Gram-positive *Corynebacterium*-like colonies obtained from cultures of clinical specimens collected from six patients (case nos. 10–15) were sent to the Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health – FNS/MS, Brazil (LDCIC/FCM/UERJ) for further phenotypic and genotypic analysis.

Positive bacterial cultures for irregular Gram-positive rods (IGPR) were preliminarily characterized by colonial morphology, pigmentation, haemolysis, and DNase activity. Phenotypic characterization of *Corynebacterium*-like colonies was performed by conventional biochemical assays and the semi-automatized API-Coryne System v. 3.0 (bioMérieux, France) with the API web decoding system (www.apweb.biomerieux.com) [14–16]. Toxigenicity

was evaluated by Vero cell cytotoxicity assays as described previously [17].

C. diphtheriae biovar mitis non-toxigenic ATCC 27010 [C7s(-) tox⁻ (NCTC 11397)] type strain and the homologous toxigenic ATCC 27012 (tox⁺) strain from the American Type Culture Collection (USA), TR241 (sucrose fermenting strain) and the strain Park-Williams no. 8 (PW8), used for toxoid vaccine preparation were used as controls of experiments in addition to the *C. diphtheriae* biovar gravis VA01 strain and *C. ulcerans* 809 human isolate.

Stock cultures in 10% skim milk with 25% added glycerol were maintained at -70 °C and recovered as required by cultivation in trypticase soy broth (TSB; Difco Laboratories, USA) [18].

Antimicrobial susceptibility testing

The sensitivity to antimicrobial agents (Oxoid, UK), penicillin G (10 U), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), rifampicin (5 µg), tetracycline (30 µg), linezolid (30 µg) and vancomycin (30 µg) was determined by the disk diffusion method using inoculum equivalent to a 0.5 McFarland standard, according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [19]. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and reconfirmed at 48 h using a cation-adjusted Mueller-Hinton agar with 5% sheep's blood. Breakpoints for the susceptible strains were used as suggested by CLSI. The breakpoints for *Staphylococcus aureus* established by CLSI were considered in cases of penicillin.

Genotypic identification and toxigenicity evaluation using the multiplex polymerase chain reaction (mPCR) technique

A mPCR using three different primer pairs developed for detection of *C. diphtheriae* and differentiation between toxigenic and non-toxigenic strains was performed based on protocols described elsewhere [20, 21]: two primer pairs targeted to domains A and B of the *tox* gene (Dipht 2F and Dipht 4R, 719 bp) and a third primer pair targeted to a region of the *dtxR* gene (DtxR1F and DtxR1R, 258 bp) [22, 23].

DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Genomic DNA was prepared following a method described previously [24]. The DNA was cleaved with *Sfi*I (New England BioLabs, USA) according to the

manufacturer's instructions. PFGE was performed in 0.5 × Tris-borate-EDTA 1.2% agarose gels at 13 °C with a CHEF DRII system (Bio-Rad, USA). The pulse times were 3–18 s over 20 h. A concatenated lambda DNA (New England BioLabs) was used as a molecular size marker. PFGE banding profiles were analysed using visual comparison among the strains and with the aid of automated analysis using the BioNumerics Fingerprinting software v. 4.0 (Applied Math, Belgium). PFGE types were identified by roman numerals and subtypes were identified by roman numerals followed by a letter. The similarity index of the strains was calculated using the Dice correlation coefficient with a band position tolerance of 1% and the unweighted pair-group method using average linkages (UPGMA) was used to construct a dendrogram. Strains were considered to belong to the same PFGE group if the similarity index was ≥ 85% band-based similarity coefficients as the cut-off values.

RESULTS

Epidemiological features

Data provided by the Public Health Secretary of the state of Maranhão showed that from January to June of 2010, suspect diphtheria cases ($n=57$) and contacts of diphtheria patients ($n=117$) were notified in different villages of three municipalities of Maranhão: Jatobá ($n=95$), Colinas ($n=46$) and São Domingos ($n=33$). A total of 27 diphtheria cases [(females ($n=18$), males ($n=9$))] was confirmed by laboratory ($n=9$), clinical ($n=7$) or clinical-epidemiological ($n=11$) criteria (Table 1). Data displayed in Figure 1 showed that the majority of the confirmed cases occurred in Jatobá ($n=20$). The highest number of diphtheria cases was observed from January to February. Most ($n=26$) of the confirmed cases occurred in children and adolescents of varied ages [<7 years ($n=13$), 7–15 years ($n=13$)] that were partially ($n=16$) or completely ($n=10$) immunized. Only one case occurred in a 31-year-old and partially immunized female patient. Three cases ended up in death: one child was partially immunized, i.e. did not receive all doses of DTP vaccine provided in the Brazilian immunization schedule [13], and the other two were completely immunized.

Clinical signs and symptoms

Clinical signs and symptoms included fever, weakness, cervical lymphadenopathy ($n=14$) and

Table 1. Clinical and epidemiological aspects of 27 confirmed cases of diphtheria notified during outbreak in Maranhão, Brazil (January–June, 2010)

Diagnostic criteria	Clinical signs and symptoms												
	Gender (Male/female)	Age group (<7, 7–20, ≥20 years)	Immunization (complete/partial)	Neck swelling	Pseudo-membrane	Tonsils	Palate	Pharynx	Larynx	Nasal cavity, lungs or skin	Paralysis of lower limbs	Serotherapy	Death
Clinical (n=7)	2/5	4/3/0	6/1	4	7	7	1	1	1	0	2	0	2
Clin/Epidemiol (n=11)	5/6	5/5/1	6/3	5	8	7	1	5	2	0	1	0	0
Laboratorial (n=9)	2/7	4/3/0	5/4	5	9	9	0	2	0	0	1	0	1

Clin/Epidemiol, Clinically compatible case epidemiologically linked to a laboratory-confirmed case; from 27 diphtheria cases, data of paralysis were not informed in nine patients: five and four cases with clinical and laboratory diagnosis, respectively. Data were provided by the Health Secretary of the state of Maranhão.

pseudomembrane formation in the tonsils ($n=25$), palate ($n=2$), pharynx ($n=8$), larynx ($n=3$) but not in the nasal cavity, lungs or skin; complications such as paralysis of lower limbs were also observed ($n=4$). Most of the patients exhibited pseudomembranes (92.59%). Several patients (51.85%) also exhibited enlarged lymph nodes of the neck giving a 'bull neck' appearance. The patients were treated with antibiotics but were not submitted to anti-diphtheria serotherapy (Table 1).

C. diphtheriae phenotypic properties

All six strains presented phenotypic characteristics of *C. diphtheriae* biovar intermedius including non-haemolytic and lipophilic colonies <1 mm. Microorganisms were positive for catalase, DNase, nitrate reductase and α -glucosidase. Pyrazinamidase, urease, gelatinase, alkaline phosphatase, esculin hydrolysis and CAMP tests gave negative results. Fermentation tests were positive for glucose, maltose, ribose and mannose; negative for glycogen, sucrose, xylose, mannitol, galactose, trehalose, arabinose and lactose. The API Coryne System confirmed the result, in which the samples showed a numerical profile 1010324.

Genotypic identification and toxigenicity evaluation by mPCR

Results of analysis by mPCR confirmed that all six strains tested corresponded to the species *C. diphtheriae* (*dtxR* gene positive). Similar to the (tox^+) control *C. diphtheriae* ATCC 27012 strain, five strains exhibited the presence of the *tox* gene. An MA136 strain isolated from the throat with pseudomembrane of a child living in Colinas, gave negative results by mPCR for the *tox* gene analogous to the (tox^-) control *C. diphtheriae* ATCC 27010 strain. Complete agreement between the results of mPCR and the gold standard Vero cell cytotoxicity assays was observed for gene *tox*-positive *C. diphtheriae* strains tested.

Antimicrobial susceptibility profiles

All clinical isolates tested showed resistance to clindamycin and susceptibility to erythromycin, rifampicin, linezolid and vancomycin. Resistance to tetracycline was observed in three (MA23, MA131, MA150)

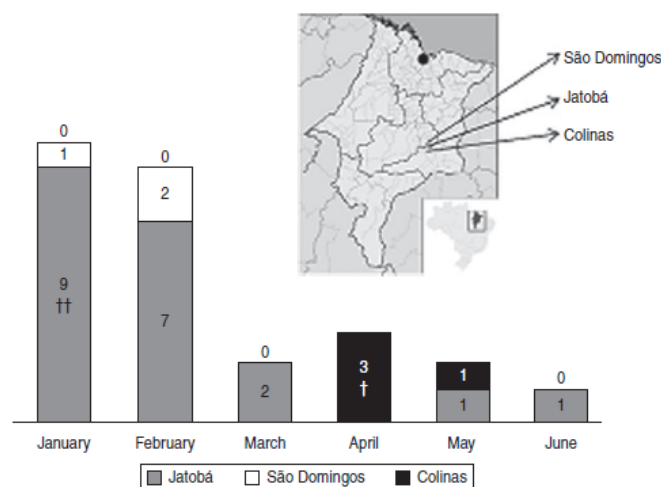


Fig. 1. Diphtheria outbreak in the state of Maranhão, Brazil. From January to June 2010. Confirmed ($n=27$) and suspect ($n=57$) cases and contacts ($n=117$) of diphtheria cases were notified in municipalities, located 400 km from the metropolitan area of São Luís (●), the capital of Maranhão State: (i) Jatobá with a surface area of 406 km² and a population of 8526 inhabitants (95 diphtheria cases); (ii) Colinas with a surface area of 2034 km² and a population of 39167 inhabitants (46 diphtheria cases); and São Domingos with a surface area of 1303 km² and a population of 33630 inhabitants (33 diphtheria cases). † Fatal cases ($n=3$).

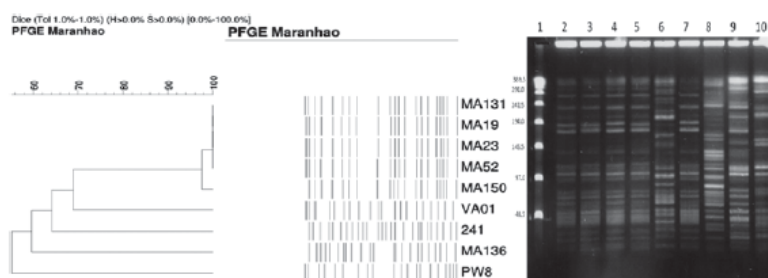


Fig. 2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) types of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from children with diphtheria living in the state of Maranhão, Brazil. Lane 1, λ DNA ladder PFGE marker; lanes 2–5, PFGE type Ia (MA19, MA23, MA52, MA131 strains, respectively); lane 6, PFGE type II (MA136 strain); lane 7, PFGE type Ib (MA150 strain); lane 8, profile III (TR241 strain); lane 9, profile IV (VA01 strain); lane 10, profile V (PW8 strain).

strains. Two strains (MA23 and MA52) showed intermediate susceptibility to penicillin G.

PFGE analysis

Three distinct PFGE types (Ia, Ib, II) were found in the *C. diphtheriae* isolates from Maranhão (Fig. 2). The PFGE subtypes Ia and Ib showed a similarity coefficient $\geq 95\%$ and were considered genetically

related. PFGE type Ia was the most frequently observed in the five strains evaluated in this study. Only the non-toxigenic MA136/13 strain exhibited PFGE type II. Three other PFGE types (III, IV, V) different from those presented by the strains from Maranhão were exhibited by the strains from Maranhão were exhibited by the PW8 strain, which is the only major strain used in toxoid vaccine production and by TR241 and VA01 strains isolated from patients with diphtheria in Rio de Janeiro city [10].

DISCUSSION

It is well known that the effectiveness of the vaccination using the dT against diphtheria caused by *C. diphtheriae* varies from 45% to 90% [25]. In the recent diphtheria outbreak in Maranhão the majority of Brazilian patients were children and many of them had been covered by a complete course of immunization. Cervical lymphadenopathy (70·37%) and neck oedema (51·85%) were observed in our study, indicating the occurrence of a severe form of the disease in Maranhão. The presence of pseudomembrane, a pathognomonic sign of the disease [1], was found in 92·59% of the patients despite immunization; mostly children (aged 1–12 years) and females; 11·12% cases were fatal, possibly due to the lack of diphtheria antitoxin and delayed treatment, as previously observed at the beginning of epidemic diphtheria in the states of the Former Union of Soviet Socialist Republics [4]. In Dhule, India, there was a shift in the median age of disease to adolescents (10–15 years) without gender differences; only 18% reported disease despite immunization. About 64% of the confirmed cases presented with a well-defined pseudomembrane [25]. In the newly independent states of the Former Soviet Union, a high proportion of cases of pharyngeal or tonsillar diphtheria without pseudomembrane formation in adults were observed [26].

A case of diphtheria with pseudomembrane formation in a Brazilian 32-year-old woman has previously been reported. Her history included complete paediatric immunization (DTP) and three doses of adult formulation tetanus and dT 2 years earlier. Clinical diagnosis of diphtheria was not made until microbiological examination of specimens confirmed *C. diphtheriae* biovar *gravis* (VA01 strain) [10]. Multilocus sequence typing (MLST) to study genetic relationships in *C. diphtheriae* strains isolated in the urban area of Rio de Janeiro showed that the VA01 strain was assigned to an already known sequence type (ST), indicating that it was part of a clonal complex that comprises strains isolated in Canada (ST80) [27]. These cases reinforced the potential susceptibility of Brazilian children and adults to diphtheria that may be caused by both endemic and imported clones.

Although in Brazil and Eastern Europe outbreaks mainly occur due to the dissemination of *C. diphtheriae* biovars *mitis* and *gravis*, respectively [4, 5], in Maranhão the diphtheria outbreak was caused by *C. diphtheriae* biovar *intermedius*. Interestingly,

diphtheria cases and deaths also caused by *C. diphtheriae* biovar *intermedius* have been documented in previously immunized individuals in India [25, 28]. By using PFGE it was possible to conclude that five toxigenic strains isolated in the state of Maranhão in 2010 were classified within the same clone or PFGE group. However, MA136 strain, the only one without the *tox* gene, was classified in a different PFGE type unrelated to toxigenic strains from Maranhão, indicating the circulation of more than one PFGE type of *C. diphtheriae* biovar *intermedius* during the outbreak which had taken place in this northern state of Brazil.

The presence of diphtheria bacilli resistant to drugs, frequently used in the treatment of infections from different sources (e.g. penicillin and erythromycin) has been noticed in some countries, including Brazil [21]. Penicillin tolerance has been hypothesized to be a cause of treatment failure of *C. diphtheriae* infections [29, 30]. Presently, even considering the break-points for *S. aureus*, we observed a decreased susceptibility to penicillin in *C. diphtheriae* strains isolated from the patients of municipalities of the state of Maranhão. Microorganisms also showed resistance to tetracycline, as previously observed in Rio de Janeiro [21]. *C. diphtheriae* strains of PFGE types Ia and Ib and II showed 100% susceptibility to erythromycin, linezolid and vancomycin. The representative strain of PFGE type II (MA136 strain) showed susceptibility to most of the antimicrobial agents tested, except clindamycin. Continuous surveys of antibiotic susceptibility of *C. diphtheriae*, especially in developing countries where diphtheria is endemic and invasive infections may occur remain necessary.

In conclusion, diphtheria remains endemic in Brazil, including the northern state of Maranhão. Unvaccinated or inadequately vaccinated people who travel to countries where diphtheria is endemic may be at increased risk. Our review of diphtheria patients hospitalized in Maranhão suggests that the clinical features of the disease in partially vaccinated patients may still be similar to those that were observed in the pre-vaccine era. However, we cannot exclude the possibility of some cases of diphtheria being misdiagnosed or not notified to the public health authorities due to the lack of knowledge by physicians regarding the clinical and laboratory diagnosis of diphtheria, particularly when patients are not fully protected against diphtheria toxin. The scarcity of epidemiological data concerning diphtheria in developing countries may be due to the fact that doctors

and microbiologists are not aware of the possibility of atypical cases of *C. diphtheriae* infection, including pharyngitis without pseudomembrane [25] as well as invasive infections such as pneumonia [31, 32], arthritis and endocarditis [21, 33–36] and catheter-related infections [16].

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPEMA, FAPERJ, CNPq, CAPES, SR-2/UERJ, Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX) and Programa Nacional de Pós-Doutorado – PNPd (CAPES/MEC).

DECLARATION OF INTEREST

None

REFERENCES

- Hadfield TL, et al. The pathology of diphtheria. *Journal of Infectious Disease* 2000; **181** (Suppl. 1): S116–120.
- Golaz A, et al. Epidemiology of diphtheria in South Dakota. *South Dakota Journal of Medicine* 2000; **53**: 281–285.
- Wagner KS, et al. Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007–2008: a multicentre European study. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 2011; **17**: 519–525.
- Dittman S, et al. Successful control of epidemic diphtheria in the State of former Union of Soviet Socialist Republics: lessons learned. *Journal of Infectious Disease* 2000; **181** (Suppl. 1): S10–20.
- Mattos-Guaraldi AL, Hirata Jr. R, Damasco PV. Diphtheria in Brazil and around the world: aspects of the current scenario. *Revista Imunizações* 2011; Suppl. 1: S2–20.
- Mattos-Guaraldi AL, et al. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – an overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2003; **98**: 987–993.
- Bitragunta S, et al. Persistence of diphtheria, Hyderabad, India, 2003–2006. *Emerging Infectious Disease* 2008; **14**: 1144–1146.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). The Yellow Book: CDC Health Information for International Travel. *Diphtheria* 2012; **1**: 162–165.
- Dias AA, et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de Saúde Pública* 2011; **45**: 1176–1191.
- Mattos-Guaraldi AL, et al. Diphtheria in a vaccinated adult in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2001; **32**: 236–239.
- Information System for Notifiable Diseases (SINAN) of the Brazilian Ministry of Health (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_difteria.pdf). Accessed 10 April 2010.
- Mattos-Guaraldi AL, et al. Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. *Journal of Medical Microbiology* 2011; **60**: 1685–1688.
- Brazilian Secretariat of Health Surveillance. Guide to Epidemiological Surveillance – 7th edn. Brasília, Brazil: Brazilian Ministry of Health, 2009; **3**: 21–43. (Series A. Standards and Technical Manuals).
- Funke G, Bernard KA. Coryneform gram-positive rods. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington (DC): American Society for Microbiology Press, 2007, pp. 485–514.
- Pimenta FP, et al. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Letters in Applied Microbiology* 2008; **46**: 307–311.
- Gomes DL, et al. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *Journal of Medical Microbiology* 2009; **58**: 1419–1422.
- Estratou A, et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; **36**: 3173–3177.
- Hirata R Jr., et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters* 2002; **215**: 115–119.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- Pimenta FP, et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *Journal of Medical Microbiology* 2008; **57**: 1438–1439.
- Pimenta FP, et al. A PCR for dtxR gene: application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Molecular and Cellular Probes* 2008; **22**: 189–192.
- Pallen M J, et al. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. *Journal of Clinical Pathology* 1994; **47**: 353–356.
- Nakao H, et al. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and the Ukraine. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; **34**: 1711–1716.
- Baio PV, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2013; **108**: 23–29.
- Phalkey RK, et al. Preventing the preventable through effective surveillance: the case of diphtheria in a rural

798 L. S. Santos and others

- district of Maharashtra, India. *BMC Public Health* 2013; **13**: 317.
26. **Kadirova R, Kartoglu Ü, Strebel PM.** Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, 1995. *Journal of Infectious Disease* 2000; **181** (Suppl. 1): S110–115.
 27. **Viguetti SZ, et al.** Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. *Epidemiology and Infection* 2012; **140**: 617–620.
 28. **Dravid MN, Joshi SA.** Resurgence of diphtheria in Malegaon and Dhule regions of north Maharashtra. *Indian Journal of Medical Research* 2008; **127**: 616–617.
 29. **Von Hunolstein C, et al.** Penicillin tolerance amongst non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from cases of pharyngitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; **50**: 125–128.
 30. **Gladin DP, et al.** Sensitivity of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Saint Petersburg to antibacterial drugs. *Antibiotics and Chemotherapy* 1999; **44**: 17–21.
 31. **Honma Y, et al.** A case of afebrile pneumonia caused by non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Japanese Journal of Infectious Disease* 2009; **62**: 327–329.
 32. **Trost E, et al.** Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *Journal of Bacteriology* 2012; **194**: 3199–3215.
 33. **Guran P, et al.** Septic arthritis due to a nontoxicogenic diphtheria bacillus. *Archives Française de Pédiatrie* 1979; **36**: 926–929.
 34. **Lin RVTP, et al.** *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis in an adult with congenital heart disease: a case report. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1994; **97**: 189–191.
 35. **Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD.** Bacteriological properties of a sucrose fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Current Microbiology* 1998; **37**: 156–158.
 36. **Hirata R, et al.** Potential pathogenic role of aggregative adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 2008; **41**: 986–991.



SHORT COMMUNICATION

Tellurite resistance: a putative pitfall in *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis?

Louisy Sanches dos Santos · Camila Azevedo Antunes · Daniel Martins de Oliveira · Lincoln de Oliveira Sant'Anna · José Augusto Adler Pereira · Raphael Hirata Júnior · Andreas Burkovski · Ana Luíza Mattos-Guaraldi

Received: 16 June 2015 / Accepted: 12 August 2015 / Published online: 26 August 2015
 © Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract *Corynebacterium diphtheriae* strains continue to circulate worldwide causing diphtheria and invasive diseases, such as endocarditis, osteomyelitis, pneumonia and catheter-related infections. Presumptive *C. diphtheriae* infections diagnosis in a clinical microbiology laboratory requires a primary isolation consisting of a bacterial culture on blood agar and agar containing tellurite (TeO_3^{2-}). In this study, nine genome sequenced and four unsequenced strains of *C. diphtheriae* from different sources, including three samples from a recent outbreak in Brazil, were characterized with respect to their growth properties on tellurite-containing agar. Levels of tellurite-resistance (Te^R) were evaluated by determining the

minimum inhibitory concentrations of potassium tellurite (K_2TeO_3) and by a viability reduction test in solid culture medium with K_2TeO_3 . Significant differences in Te^R levels of *C. diphtheriae* strains were observed independent of origin, biovar or presence of the *tox* gene. Data indicated that the standard initial screening with TeO_3^{2-} -selective medium for diphtheria bacilli identification may lead to false-negative results in *C. diphtheriae* diagnosis laboratories.

Keywords *Corynebacterium diphtheriae* · Diphtheria · Invasive infections · Tellurite-resistance · Laboratory diagnosis

Louisy Sanches dos Santos and Camila Azevedo Antunes contributed equally for the first authorship in this manuscript.

L. S. dos Santos · C. A. Antunes
 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
 e-mail: louisysanchesuerj@gmail.com

C. A. Antunes
 e-mail: azevedoantunes.camila@gmail.com

C. A. Antunes · D. M. de Oliveira ·
 L. O. Sant'Anna · J. A. A. Pereira · R. Hirata Júnior ·
 A. L. Mattos-Guaraldi (✉)
 Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Av. 28 de Setembro,
 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, Rio De Janeiro,
 RJ CEP: 20 551-030, Brazil
 e-mail: guaraldi@uerj.br

D. M. de Oliveira
 e-mail: daniel.0246@gmail.com

L. O. Sant'Anna
 e-mail: lincolnsantanna2013@gmail.com

J. A. A. Pereira
 e-mail: josep@uerj.br

R. Hirata Júnior
 e-mail: hirata@uerj.br

C. A. Antunes · A. Burkovski
 Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,
 Erlangen, Germany
 e-mail: andreas.burkovski@fau.de

Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak

Cassius de Souza¹, Yuri Vieira Faria¹, Lincoln de Oliveira Sant'Anna¹, Vanilda Gonçalves Viana¹, Sérgio Henrique Seabra², Mônica Cristina de Souza¹, Verônica Viana Vieira³, Raphael Hirata Júnior¹, Lílian de Oliveira Moreira⁴*, Ana Luíza de Mattos-Guaraldi¹

¹Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Centro Colaborador de Referência e Pesquisa em Difteria/Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Laboratório de Bacteriologia e Imunologia Clínica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corynebacterium striatum is a potentially pathogenic microorganism that causes nosocomial outbreaks. However, little is known about its virulence factors that may contribute to healthcare-associated infections (HAIs). We investigated the biofilm production on abiotic surfaces of multidrug-resistant (MDR) and multidrug-susceptible (MDS) strains of *C. striatum* of pulsed-field gel electrophoresis types I-MDR, II-MDR, III-MDS and IV-MDS isolated during a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. The results showed that *C. striatum* was able to adhere to hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces. The *C. striatum* 1987/I-MDR strain, predominantly isolated from patients undergoing endotracheal intubation procedures, showed the greatest ability to adhere to all surfaces. *C. striatum* bound fibrinogen to its surface, which contributed to biofilm formation. Scanning electron microscopy showed the production of mature biofilms on polyurethane catheters by all pulsotypes. In conclusion, biofilm production may contribute to the establishment of HAIs caused by *C. striatum*.

Key words: biofilm - *Corynebacterium striatum* - epidemic clone - fibrinogen - multi-resistance - nosocomial outbreak

Corynebacterium striatum is an emerging multidrug-resistant (MDR) potentially pathogenic microorganism that causes nosocomial infection in patients who have experienced long hospital admissions, those who have received several courses of antibiotics (Camello et al. 2003, Otsuka et al. 2006, Renom et al. 2007, Baio et al. 2013), those with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) or cancer and those who have received a transplant (Tarr et al. 2003, Martins et al. 2009). Cases of severe infections in both immunocompromised and immunocompetent individuals and nosocomial outbreaks due to MDR *C. striatum* are increasing in both industrialised and developing countries. *C. striatum* has been associated with cases of pulmonary infections, sepsis, endocarditis, meningitis, osteomyelitis, arthritis, sinusitis, skin wounds and intrauterine infections (Rufael & Cohn 1994, Weiss et al. 1996, Fernández-Ayala et al. 2001, Camello et al. 2003, Renom et al. 2007, Scholle 2007, Boltin et al. 2009, Campanile et al. 2009, Martins et al. 2009, Moore et al. 2010, Oliva et al. 2010, Baio et al. 2013).

Genotyping analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has identified PFGE types associated with nosocomial outbreaks of respiratory origin and with resistance to a broad range of antibiotics (MDR phenotype). In Italy, MDR *C. striatum* isolates have been recovered from hospitalised patients who have undergone surgery or have been admitted to intensive care units (ICUs). These isolates have been responsible for cases of ventilator-associated pneumonia and tracheobronchitis, catheter-related sepsis and wound infections. Infections caused by this species have been strongly associated with devices, including not only tubes and catheters, but also sternal surgical wound wires (Campanile et al. 2009). *C. striatum* has also been isolated from other materials for hospital use, such as endotracheal tubes (Martinez-Martinez et al. 1995). Earlier genotype studies have confirmed that *C. striatum* may be transmitted between patients, from person to person and via caretakers (Leonard et al. 1994). Recently, a nosocomial outbreak caused by *C. striatum* was documented in Rio de Janeiro (RJ), Brazil. PFGE analysis indicated the presence of four PFGE profiles, including two related clones of MDR strains (PFGE I and II). The results of these studies demonstrate the predominance of PFGE-type I MDR isolates that are mainly isolated from ICUs and surgical wards. *C. striatum* strains have largely been isolated in pure culture from tracheal aspirates of patients undergoing endotracheal intubation procedures (Baio et al. 2013).

Currently, more than half of the infectious diseases that affect mildly immunocompromised patients involve bacterial species that are commonly encountered in the environment or constitute the body's normal flora, including

doi: 10.1590/0074-02760140373

Financial support: CAPES (E26/101.937/2009), FAPERJ (E26/110.735/2012), CNPq (300236/2010-7), SR-2/UERJ, PNPd-CAPES/MEC (0370088)

* Corresponding author: lilian@pharma.ufrj.br

Received 10 October 2014

Accepted 29 January 2015

online | memorias.ioc.fiocruz.br