

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Juliana Nunes Ramos

**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES SUGESTIVAS DE CORINEBACTÉRIAS  
ISOLADAS DE SÍTIOS INTRAVENOSOS**

Rio de Janeiro

2014

Juliana Nunes Ramos

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES SUGESTIVAS DE CORINEBACTÉRIAS  
ISOLADAS DE SÍTIOS INTRAVENOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Verônica Viana Vieira

Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Ramos, Juliana Nunes

Caracterização de estirpes sugestivas de corinebactérias isolados de sítios intravenosos./Juliana Nunes Ramos - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

114 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

OrientadoraS: Verônica Viana Vieira e Ana Luiza de Mattos Guaraldi

1. *Corynebacterium*. 2. Corineformes. 3. Identificação Molecular. 4. Infecções invasivas  
5. Vigilância Sanitária.

Characterization of suggestive strains of corynebacteria isolated from intravenous sites.

Juliana Nunes Ramos

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES SUGESTIVAS DE CORINEBACTÉRIAS  
ISOLADAS DE SÍTIOS INTRAVENOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Verônica Viana Vieira

Ana Luiza de Mattos-Guaraldi

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Thereza Cristina Ferreira Camello (Doutora)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Robson de Souza Leão (Doutor)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Verônica Viana Vieira (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Doutora) – Orientadora  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

À minha mãe, por ter sido tão essencial na  
realização deste sonho.

## AGRADECIMENTOS

Àquele que me deu a vida e que guia e protege os meus passos: Deus.

Às Dras. Ana Luiza Guaraldi e Verônica Vieira, pela oportunidade de realização deste estudo, pela atenção, carinho, orientação e principalmente pelos ensinamentos que me permitiram esta conquista. Conto com vocês para o doutorado!

À Thereza Camello por ter me passado seus valiosos conhecimentos no estágio no LABAC e tudo que sabe sobre diagnóstico.

Ao professor Raphael Hirata Jr. pela sua inteligência inestimável, sempre disponível em ajudar.

À Dra. Maria Helena Villas Boas, pela atenção e revisão desta dissertação.

Aos professores da banca por terem aceitado o convite.

Ao Paulo Baio e Livia por terem sido tão prestativos nesse tempo todo.

Aos amigos do IDBAC/INCQS, João e Elisa, pela companhia, atenção e boa vontade sempre.

Aos amigos Higor, Liliane e Cassius e à todos os colegas do LDCIC/UERJ que me ensinaram os primeiros passos e que de alguma forma contribuíram para tudo que hoje aprendi.

À Érica e à Rosa, do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do IOC, pelo valioso suporte técnico na elaboração das placas de sequenciamento.

A minha família, em especial a minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu estivesse aqui. Ao meu pai, meus queridos irmãos, meus amados sobrinhos minhas cunhadas e minha avó. Vocês foram essenciais nesta caminhada. Obrigada pela companhia de vocês que sempre me deixou revigorada em todas as minhas idas até Minas.

Ao meu namorado Magno, pela dedicação e companheirismo, por sempre me levantar em todos os momentos difíceis que passei e por comemorar todas as minhas conquistas.

À Coordenação da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

À CAPES pelos dois anos de bolsa concedidos, CNPq, FAPERJ e Fiocruz pelo apoio financeiro concedido pelo desenvolvimento deste projeto.

## RESUMO

Casos de infecções invasivas por corinebactérias, colonizadoras do ambiente e da microbiota humana ou de animais, tem sido crescentes em decorrência de melhor sobrevivência de indivíduos imunocomprometidos. Além da fenotipagem, métodos moleculares tem sido fundamentais na identificação de bastonetes Gram-positivos irregulares (BGPI). O presente estudo teve como objetivo a caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de corinebactérias isoladas de sítios intravenosos de pacientes internados em um hospital universitário no Rio de Janeiro. Neste sentido, 60 estirpes de microrganismos Gram-positivos foram analisadas por metodologia fenotípica convencional, sistemas API Coryne e Vitek 2 (bioMérieux) e análise das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*, utilizada como metodologia de referência para avaliação dos sistemas fenotípicos. Os dados indicaram o isolamento de *Corynebacterium striatum* (44,68 %), *Corynebacterium amycolatum* (31,91 %), *Corynebacterium jeikeium* (8,51 %), *Corynebacterium urealyticum* (6,39 %), *Corynebacterium diphtheriae* (4,26%), *Corynebacterium simulans* (2,12%) e *Corynebacterium minutissimum* (2,12%) do sangue de pacientes fazendo o uso ou não de dispositivos invasivos. As espécies predominantes *C. striatum* e *C. amycolatum* apresentaram 8 e 9 perfis de resistência aos agentes antimicrobianos, respectivamente. O perfil de resistência com sensibilidade apenas à tetraciclina, linezolida e vancomicina, foi prevalente durante um surto epidêmico de *C. striatum* ocorrido em 2010. Este mesmo perfil foi observado para *C. amycolatum*, *C. jeikeium* e *C. urealyticum*. A identificação definitiva da maioria das estirpes de *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. simulans* e *C. minutissimum* só foi possível pela genotipagem. Interessantemente, a análise das sequências do gene 16S rRNA permitiu a identificação de outros microrganismos como *Abiotrophia defectiva* (6,67%), *Arthrobacter* (1,67%), *Brevibacterium* (11,67%) e *Microbacterium* (1,67%). Em conclusão, BGPI isolados de infecções invasivas não devem ser negligenciados e análise das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* podem contribuir na identificação definitiva das espécies de microrganismos Gram-positivos, incluindo as corinebactérias envolvidas nesses processos infecciosos.

Palavras-chave: *Corynebacterium*. Infecções invasivas. Corinebactérias. Corineformes. Sítios intravenosos. Genes conservados.



## ABSTRACT

Cases of invasive infections corynebacteria , colonizing the environment and human and animal microbiota, has been increasing due to better survival of immunocompromised individuals. Besides phenotyping, molecular methods have been of great value in the identification of Gram-positive irregular rods (BGPI). The present study aimed to phenotypic and genotypic characterization of isolates from corynebacteria isolated of intravenous sites of patients at a university hospital in Rio de Janeiro. Thus, 60 isolates of Gram-positive microorganisms were analyzed by conventional phenotype methodology, and Vitek and API Coryne 2 systems (bioMérieux) and by sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes. The genotypic identification was used as reference methods for evaluation of phenotypic systems. The data indicated the isolation of *Corynebacterium striatum* (44,68 %), *Corynebacterium amycolatum* (31,91 %), *Corynebacterium jeikeium* (8,51%), *Corynebacterium urealyticum* (6,39 %), *Corynebacterium diphtheriae* (4,26%), *Corynebacterium simulans* (2.12%) and *Corynebacterium minutissimum* (2,12%) from the blood of patients making use or not of invasive devices. The predominant species *C. striatum* and *C. amycolatum* presented 8 and 9 profiles of resistance to antimicrobial agents, respectively. The resistance profile with sensitivity just to tetracycline, linezolid and vancomycin, was prevalent during an outbreak of *C. striatum* occurred in 2010. The same profile was observed for *C. amycolatum*, *C. jeikeium* and *C. urealyticum*. The definitive identification of most strains of *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. simulans* and *C. minutissimum* was possible only by genotyping . Interestingly, the sequence analysis of the 16S rRNA gene allowed the identification of other microorganisms such as *Abiotrophia defectiva* (6,67%), *Arthrobacter* (1,67 %), *Brevibacterium* (11.67 %) and *Microbacterium* (1.67 %). In conclusion, BGPI isolates from invasive infections should not be neglected and sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes can contribute to the definitive identification of the species of Gram-positive microorganisms, including corynebacteria involved in these infections.

Keywords: *Corynebacterium*. Invasive infections. Corynebacteria. Coryneform. Intravenous sites. Conserved gene

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Representação gráfica das regiões de variabilidade (eixo y) no gene <i>rpoB</i> de <i>Corynebacterium</i> . .....	31
<b>Figura 2.</b> Avaliação da identificação fenotípica convencional quanto ao gênero em comparação com a metodologia de referência.....	48
<b>Figura 3.</b> Avaliação da identificação fenotípica convencional para as espécies <i>Corynebacterium striatum</i> e <i>Corynebacterium amycolatum</i> em comparação com a metodologia de referência.....	48
<b>Figura 4.</b> Identificação baseada nos critérios do sistema API Coryne.....	50
<b>Figura 5.</b> Avaliação da identificação realizada pelo sistema API Coryne quanto ao gênero em comparação com a metodologia de referência. ....	52
<b>Figura 6.</b> Avaliação da identificação realizada pelo sistema API Coryne para as espécies <i>Corynebacterium striatum</i> e <i>Corynebacterium amycolatum</i> em comparação com a metodologia de referência. ....	52
<b>Figura 7.</b> Identificação baseada nos critérios do sistema VITEK 2.....	54
<b>Figura 8.</b> Avaliação da identificação realizada pelo sistema VITEK 2 quanto ao gênero em comparação com a metodologia de referência. ....	56
<b>Figura 9.</b> Avaliação da identificação realizada pelo sistema VITEK 2 para as espécies <i>Corynebacterium striatum</i> e <i>Corynebacterium amycolatum</i> em comparação com a metodologia de referência. ....	56
<b>Figura 10.</b> Gêneros bacterianos caracterizados neste estudo utilizando a análise das sequências do gene 16S rRNA. ....	58
<b>Figura 11.</b> Avaliação da caracterização genotípica das estirpes de <i>Corynebacterium</i> utilizando as análises das sequências dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> . ....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Testes complementares para a diferenciação de espécies pertencentes ao Complexo XSMA .....	28
<b>Tabela 2</b> – Dados das 60 estirpes bacterianas utilizadas neste estudo.....	34
<b>Tabela 3</b> - Iniciadores utilizados para as reações de amplificação e sequenciamento dos genes conservados .....	40
<b>Tabela 4</b> - Resultados dos testes bioquímicos convencionais.....	45
<b>Tabela 5</b> - Testes complementares para as estirpes de <i>Corynebacterium striatum</i> .....	49
<b>Tabela 6</b> - Testes complementares para as estirpes de <i>Corynebacterium amycolatum</i> .....	49
<b>Tabela 7</b> - Comparação dos resultados obtidos pelo sistema semi-automatizado API Coryne com os obtidos pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> .....	50
<b>Tabela 8</b> - Comparação dos resultados obtidos pelo sistema automatizado VITEK 2 com os obtidos pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> .....	54
<b>Tabela 9</b> - Identificação genotípica de <i>Corynebacterium striatum</i> pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> .....	58
<b>Tabela 10</b> - Identificação genotípica de <i>Corynebacterium amycolatum</i> pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> .....	59
<b>Tabela 11</b> - Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> de outras espécies de <i>Corynebacterium</i> .....	59
<b>Tabela 12</b> - Identificação genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA de outros gêneros bacterianos.....	60
<b>Tabela 13</b> - Resultados obtidos pelos métodos de identificação fenotípica e genotípica realizados neste estudo.....	61
<b>Tabela 14</b> - Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de <i>Corynebacterium striatum</i> .....	63
<b>Tabela 15</b> - Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de <i>Corynebacterium amycolatum</i> .....	64
<b>Tabela 16</b> - Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de <i>Corynebacterium</i> .....	65
<b>Tabela 17</b> - Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes pertencentes a outros gêneros .....	65

<b>Tabela 18</b> - Porcentagem de estirpes de <i>Corynebacterium</i> suscetíveis aos agentes antimicrobianos. ....	66
<b>Tabela 19</b> - Distribuição das estirpes das espécies de <i>Corynebacterium</i> prevalentes nas unidades hospitalares do HUPE. ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANC	<i>Anaerobe and Corynebacterium</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGPI	bastões Gram-positivos irregulares
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCIH	Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CECIH	Comissões Estaduais de Controle de Infecção Hospitalar
CGLAB	Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMCIH	Comissões Municipais de Controle de Infecção Hospitalar
CTA	Cystine Tryptone Agar
DAU	Duplo açúcar uréia
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
ESC	Esculina
GEL	Gelatina
GLYG	Glicogênio
GP	<i>Gram Positive card</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
INCS	Infecções Nosocomiais da Corrente Sanguínea
IPCS	Infecções Primárias da Corrente Sanguínea
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde
LABAC	Laboratório de Bacteriologia
LACEN	Laboratório Central
LDCIC	Laboratório de Corinebactérias de Importância Clínica
mM	milimolar
Mol	moles
Ng	nanograma
NIT	nitrato
O	oxidativo

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PAL	fosfatase alcalina
pb	pares de base
PCIH	Programas de Controle de Infecção Hospitalar
PCR	reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PyrA	pirrolidonil arilamidase
PYZ	pirazinamidase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNase	ribonuclease
Rpm	rotações por minuto
<i>rpoB</i>	gene codificador da subunidade beta da RNA polimerase
Rrn	operon ribossomal
rRNA	RNA ribossomal
16S rRNA	RNA ribossomal 16 svedberg
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
Taq	DNA polimerase isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
U	unidades
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	unidade formadora de colônia
URE	urease
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
$\alpha$ GLU	alfa-glucosidase
$\beta$ GAL	beta-galactosidase
$\beta$ GUR	beta-glucuronidase
$\beta$ NAG	N-acetil-beta-glucosaminidase
$\mu$ l	Microlitro
$^{\circ}$ C	graus Celsius
$\mu$ m	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA .....	15
1.2 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS) E A SAÚDE PÚBLICA.....	17
1.3 INFECÇÕES NOSOCOMIAIS DA CORRENTE SANGUÍNEA (INCS).....	18
1.4 MULTIRRESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	21
1.5 CORINEBACTÉRIAS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA .....	23
1.6 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	25
1.7 IMPORTÂNCIA DE TÉCNICAS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE CORINEBACTÉRIAS.....	28
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
3.1 GERAL .....	33
3.2 ESPECÍFICOS .....	33
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	34
4.1 ESTIRPES BACTERIANAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	34
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	36
4.2.1 Provas bioquímicas convencionais .....	37
4.2.2 Sistema API Coryne .....	37
4.2.3 Sistema VITEK 2 .....	38
4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA .....	39
4.3.1 Extração do DNA Total.....	39
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
4.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose .....	40
4.3.4 Purificação dos Produtos de PCR.....	41
4.3.5 Sequenciamento e análise das sequências nucleotídicas.....	41
4.4 SUSCETIBILIDADE AOS DIVERSOS AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	42
<b>5 RESULTADOS</b> .....	43
5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	43
5.1.1 Testes bioquímicos convencionais.....	43
5.1.2 Sistema API Coryne .....	44

5.1.3 Sistema VITEK 2.....	53
5.2. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA .....	57
5.4 SUSCETIBILIDADE AOS DIVERSOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	63
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE A – Comprovante de submissão do artigo.....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE B – Artigo submetido .....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE C – Trabalho apresentado em congresso.....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE D – Demais artigos publicados durante o mestrado. ....</b>	<b>110</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

De acordo com a Lei Orgânica nº 8.080 de 1990, artigo 6º, parágrafo 1º, Vigilância Sanitária é um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo, bem como o controle da prestação de serviços que se relacionem direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

A Vigilância Sanitária está ligada ao serviço de saúde de um país. No caso do Brasil, ao Sistema Único de Saúde (SUS). A saúde é um direito fundamental garantido pela Constituição Federal de 1988 e é através do SUS que se concretiza esse direito. O SUS é constituído pelo conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, da Administração direta e indireta e das fundações mantidas pelo Poder Público (BRASIL, 1988), sendo que a execução das ações de vigilância sanitária é uma das competências do SUS, conforme o artigo 6º, inciso I, da Lei Orgânica da Saúde nº 8.080 de 1990 (BRASIL, 1990).

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, instituído em 26 de janeiro de 1999 pela Lei nº 9.782 é um instrumento privilegiado de que o SUS dispõe para realizar seu objetivo de prevenção e promoção da saúde. O Sistema engloba unidades nos três níveis de governo com responsabilidades compartilhadas. No nível federal, estão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), instituída também pela Lei nº 9.782 e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (BRASIL, 1999). No nível estadual, estão o órgão de vigilância sanitária e o Laboratório Central de Saúde (Lacen) de cada uma das 27 Unidades da Federação. No nível municipal, estão os serviços de vigilância sanitária dos 5561 municípios brasileiros, muitos dos quais ainda em fase de organização. Participam indiretamente do Sistema: Conselhos de Saúde e

Conselhos de Secretários de Saúde. Interagem e cooperam com o Sistema: órgãos e instituições, governamentais ou não, de diversas áreas (ANVISA, 2014a).

O INCQS age em estreita cooperação com a Anvisa atuando em áreas de pesquisa, ensino e como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, serviços e ambientes vinculados à vigilância sanitária, como os hospitais (INCQS, 2008). Os ambientes hospitalares são constantemente desafiados por complicações infecciosas relacionadas à assistência, definidas como infecções hospitalares, atualmente denominadas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) como sendo aquelas adquiridas após a admissão do paciente e que se manifestem durante a internação ou após a alta, quando puderem ser relacionadas com a internação ou procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998, SANTOS et al, 2005).

As IRAS representam um risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais e são um grave problema de Saúde Pública. A prevenção e controle das IRAS envolvem medidas de qualificação de assistência hospitalar, de vigilância sanitária e outras, tomadas no âmbito do Estado, do Município e de cada hospital, atinentes ao seu funcionamento. Atualmente, as diretrizes gerais para o Controle das Infecções em Serviços de Saúde são delineadas pela Anvisa (ANVISA, 2013a).

Em 2012, a Anvisa publicou a Portaria nº 1.218, que instituiu a Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecção Relacionada à Assistência em Saúde, na qual elaborou o Programa Nacional de Prevenção e Controle das IRAS, cujo objetivo geral é reduzir, em âmbito nacional, a incidência das IRAS e da resistência microbiana. A responsabilidade de acompanhamento dos Programas de Controle de Infecções Hospitalares nos hospitais é da Vigilância Sanitária, a qual não somente inspeciona como também deve prestar cooperação técnica aos hospitais, orientando para o exato cumprimento e aplicação das diretrizes estabelecidas pela legislação sanitária pertinente (ANVISA, 2013b).

Com a missão de proteger e promover a saúde da população, a Anvisa é responsável por definir as normas gerais, os critérios e os métodos para a prevenção e controle das IRAS no Brasil, coordenando as ações e estabelecendo um sistema de avaliação e divulgação dos indicadores nacionais (ANVISA, 2013c). Desta forma, as ações de vigilância sanitária têm como objetivo eliminar, diminuir e/ou prevenir riscos e agravos à saúde do indivíduo e da coletividade, bem como o

controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1998, ANVISA, 2000, GIUNTA; LACERDA, 2006).

## 1.2 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS) E A SAÚDE PÚBLICA

O sistema de saúde é constantemente desafiado pelas IRAS e representam um dos mais importantes problemas de Saúde Pública no mundo, que acomete tanto os países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento. Além das elevadas taxas de morbidade e mortalidade, outras consequências são o aumento do tempo de internação e dos custos decorrentes tanto para a instituição quanto para os próprios pacientes e familiares, além da ameaça constante da disseminação de bactérias multirresistentes. Ao prolongar o tempo de internação, gera-se uma elevação no consumo de medicamentos e aumento dos custos adicionais, além de retardar o retorno do paciente às suas atividades normais (CDC, 1979, PEREIRA, 1993, ANVISA, 2004a, OLIVEIRA et al, 2009, SYDNOR; PERL, 2011).

A assistência à saúde vem, ao longo dos tempos, evoluindo com os avanços científicos e tecnológicos, e tem refletido em melhoria das ações de saúde para a população. Porém, se por um lado se observa o desenvolvimento científico-tecnológico nas ações de saúde, por outro, tem-se observado que problemas antigos ainda persistem como é o caso das IRAS (ANVISA, 2000, ANVISA, 2013b).

Historicamente, no Brasil, o Controle das Infecções Hospitalares teve seu marco referencial com a Portaria do Ministério da Saúde nº 196, de 24 de junho de 1983 (revogada e substituída pela Portaria do Ministério da Saúde nº 930, de 27 de agosto de 1992), que estabeleceu a obrigatoriedade para todos os hospitais do país a implantação e manutenção das Comissões de Controle de Infecções Hospitalares, independente de sua natureza jurídica (BRASIL, 1983, 1992, ANVISA, 2014b).

O reconhecimento das IRAS como um problema de Saúde Pública, pelo Governo Federal, foi consolidado em 1997 com a publicação da Lei nº. 9.431, que estabeleceu a obrigatoriedade da manutenção dos Programas de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) em todos os hospitais brasileiros. Nesta Lei, fica definido como PCIH, o “conjunto de ações desenvolvidas, deliberada e sistematicamente,

com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares” (BRASIL, 1997). No entanto, é reconhecido, que muitos hospitais têm dificuldades ou não operacionalizam o PCIH conforme recomendações governamentais, principalmente aqueles longe dos grandes centros. Legislações instituídas, portanto, não são garantias de sua execução e, principalmente com qualidade e resolução (SANTOS et al, 2005, GIUNTA; LACERDA, 2006).

A exigência de manutenção das Comissões de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH), Comissões Estaduais de Controle de Infecções Hospitalares (CECIH) e Comissões Municipais de Controle de Infecções Hospitalares (CMCIH) foi normalizada pelo Ministério da Saúde por meio da Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, que contextualiza a problemática das infecções também na dimensão do SUS, ao determinar as competências das três esferas de governo na sua prevenção (BRASIL, 1998, ANVISA, 2005).

### 1.3 INFECÇÕES NOSOCOMIAIS DA CORRENTE SANGUÍNEA (INCS)

A identificação de bactérias em amostras de sangue representa importante recurso diagnóstico em doenças infecciosas. Bacteremia é o termo que designa a presença de micro-organismos viáveis na corrente sanguínea. Na maioria das vezes, as bacteremias são causadas por um único micro-organismo. Contudo, em algumas situações, caracterizam-se por etiologia polimicrobiana. As bacteremias frequentemente estão associadas a um aumento considerável nas taxas de morbidade e mortalidade, além de representarem umas das mais significativas complicações infecciosas, o que torna a hemocultura um exame de importante valor preditivo de infecção. A hemocultura positiva estabelece ou confirma que existe uma etiologia infecciosa para a doença do paciente. A bacteremia pode ser classificada em três categorias: (CLSI, 2007a, SEIFERT, 2009, ARAÚJO, 2012, ANVISA, 2013c).

**-Bacteremia transitória** geralmente é rápida (podendo levar alguns minutos ou poucas horas) e ocorre mais frequentemente após a manipulação de tecido e/ou mucosa infectados ou colonizados, como por exemplo, durante o procedimento dentário ou cateterização percutânea do sistema vascular. Este tipo de bacteremia ocorre em algumas infecções

agudas, localizadas ou sistêmicas, como pneumonias, meningites, artrites sépticas e osteomielites;

**-Bacteremia intermitente** é quando a bacteremia se manifesta em intervalos variáveis de tempo com o mesmo micro-organismo. Geralmente ocorre em processos infecciosos relacionados a abscessos intra-abdominais, pélvicos, hepáticos e outros, configurando assim causas frequentes de febre de origem desconhecida;

**-Bacteremia persistente** é uma característica da endocardite infecciosa aguda e subaguda e de outras infecções endovasculares. Este padrão também é encontrado nas primeiras semanas de febre tifoide e na brucelose e ocorre mesmo enquanto o paciente esteja recebendo antibioticoterapia adequada. Concentrações insuficientes do antimicrobiano atingidas na corrente sanguínea ocorrem no início da terapêutica. Já os episódios que ocorrem tardiamente devem-se a drenagem inadequada do foco infeccioso ou pela debilidade das defesas do hospedeiro.

As INCS são multifatoriais e apresentam fisiopatologia, critérios diagnósticos, implicações terapêuticas, prognósticas e preventivas distintas. Geralmente são indicativas de eventos graves e apresentam custos adicionais elevados por sobrevivente, prolongamento do tempo de internação nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (ERBAY et al, 2006, ANVISA, 2013c).

Apesar da vasta literatura internacional sobre INCS, sobretudo na última década, os estudos brasileiros são escassos e muitas vezes realizados a partir da vigilância microbiológica laboratorial, sem vinculação com dados clínicos, ou tendo como objeto de estudo apenas as infecções nosocomiais (GUILARDE et al, 2007, ANVISA, 2013c).

A maioria das INCS estão associadas ao uso de cateteres venosos centrais, com taxas de bacteremia substancialmente mais elevadas do que nos doentes sem cateter. Estima-se que cerca de 60% das bacteremias nosocomiais sejam associadas a algum dispositivo intravascular e segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), essa taxa varia consideravelmente conforme a dimensão do hospital, os serviços/unidades e tipo de cateter (GUILARDE et al, 2007, ANVISA, 2013c). Segundo a Anvisa (ANVISA, 2013c), as fontes mais comuns das INCS (origem comunitária e/ou hospitalar) são: dispositivos intravasculares (19%), trato geniturinário (17%), trato respiratório (12%), intestino e peritônio (5%), pele (5%), trato biliar (4%), abscesso intra-abdominal (3%), outros sítios (8%) e de sítios desconhecidos (27%).

A bacteremia relacionada com o cateter surge quando num doente com cateter intravascular e pelo menos uma hemocultura positiva obtida através de veia

periférica, manifestações clínicas de infecção (febre, hipotensão) e sem a presença aparente de outras fontes de infecção excetuando o cateter (SILVA et al, 2009, ANVISA, 2013c).

As taxas de infecção também podem ser influenciadas por fatores de risco intrínsecos dos doentes, como o tipo e gravidade da doença, assim como pelos parâmetros relacionados com o cateter, nomeadamente as condições em que foram colocados ou o local de inserção (ANVISA, 2013c).

Pacientes que são admitidos no hospital com doenças graves estão sob o maior risco de desenvolver sepse, isto por causa da doença de base, do uso prévio de antibióticos, presença dentro do hospital de bactérias resistentes aos medicamentos, uso frequente de cateteres intravenosos, sonda vesical ou drenos em feridas. O termo sepse refere-se a condição pela qual a resposta do organismo ao agente infeccioso se manifesta, por meio de sinais e sintomas da doença, como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, independente da presença ou não de hemocultura positiva. A infecção que leva à sepse pode ser adquirida fora ou dentro do hospital. A maioria dos episódios sépticos tem origem hospitalar e com certa frequência envolvem micro-organismos que apresentam grande resistência aos antimicrobianos, estando associados a taxas de mortalidade com tendência a serem superiores as dos episódios que ocorrem na comunidade (INTERNATIONAL SESPIS FORUM, 2002, ANVISA, 2013c).

Do ponto de vista do tratamento, são importantes a presença ou ausência de hemocultura positiva, sinais sistêmicos de infecção, presença ou ausência de foco primário de origem, presença ou ausência de acesso vascular, tipo do acesso, envolvimento e possibilidade de remoção do mesmo, sinais locais de infecção do cateter (ANVISA, 2009, 2013c).

Duas síndromes apresentam aspectos diagnósticos e preventivos específicos, e que merecem grande atenção e monitorização sistemática: i) As infecções primárias da corrente sanguínea (IPCS), que são aquelas infecções de consequências sistêmicas graves, bacteremia ou sepse, sem foco primário identificável. Há dificuldade de se determinar o envolvimento do cateter central na ocorrência da IPCS. Com finalidade prática, as IPCS serão associadas ao cateter, se este estiver presente ao diagnóstico. As IPCS estão entre as infecções mais comumente relacionadas à assistência à saúde e também aos elevados índices de mortalidade; ii) Infecções relacionadas ao acesso vascular, que são infecções que

ocorrem no sítio de inserção do cateter, sem repercussões sistêmicas. A maioria das infecções dessa natureza são infecções relacionadas ao acesso vascular central. O risco de infecção, relacionado ao acesso vascular, está associado à localização do acesso, solução infundida, experiência do profissional que realiza o procedimento, tempo de permanência, tipo e manipulação do cateter, entre outros. Tais fatores constituem pontos estratégicos importantes para ações preventivas dessas infecções (MESIANO; MERCHÁN-HAMANN, 2007, ANVISA, 2013c).

#### 1.4 MULTIRRESISTÊNCIA AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana constitui um problema de Saúde Pública mundial que desperta a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), o CDC, a Anvisa e associações de controladores de infecções hospitalares. Em virtude das alternativas de tratamento tornarem-se muito reduzidas, diversas iniciativas vem sendo tomadas para controlar a disseminação das bactérias resistentes. No entanto, constatações de resistência bacteriana na comunidade tem sido relatadas e, de forma preocupante, com um perfil de acometimento de indivíduos diferentes daqueles hospitalizados, ou seja, indivíduos jovens saudáveis e sem fatores de risco previamente detectados (OLIVEIRA et al, 2009).

São considerados micro-organismos multirresistentes os que apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al, 2012). Estudos realizados pelo CDC demonstram que a taxa de infecções graves por bactérias multirresistentes é ainda maior nos países em desenvolvimento (OMS, 2012).

A ampla utilização indevida de antibióticos no ambiente hospitalar e pela população extra-hospitalar (comunitária) e agropecuária, constituem uns dos fatores que leva ao aumento da resistência microbiana e exige medidas urgentes para combater o surgimento de novas cepas bacterianas multirresistentes, inclusive aos medicamentos antimicrobianos recentemente comercializados, levando a consequências importantes, com efeitos diretos na problemática das IRAS. Dados da OMS apontam que mais de 50% das prescrições de antibióticos no mundo são

inadequadas. O problema, de amplitude mundial, evidencia-se com o aumento do número de casos de infecção hospitalar provocados por micro-organismos resistentes aos antibióticos disponíveis para uso (ANVISA, 2007, 2010).

A restrição de acesso a exames microbiológicos acarreta a adoção de terapias empíricas sem conhecimento do padrão de resistência local, favorecendo o uso desnecessário de antimicrobianos, prolongamento da internação, aumento na morbidade e mortalidade e nos custos assistenciais. A insuficiência de políticas hospitalares de uso racional de medicamentos e produtos com ação antimicrobiana contribui para a seleção e a disseminação de cepas de micro-organismos multirresistentes em serviços de saúde (ANVISA, 2005).

É consenso que a resistência bacteriana tem sido um importante fator no aumento dos índices de mortalidade em pacientes criticamente doentes, especialmente aqueles atendidos nas UTI, que são mais vulneráveis a serem colonizados ou infectados por micro-organismos multirresistentes (TEIXEIRA et al, 2004, LÓPEZ-PUEYO, 2011). Cerca de 10% dos pacientes internado em hospitais infectam-se devido a procedimentos invasivos e/ou a terapia imunossupressora. São considerados infectados por micro-organismos multirresistentes os pacientes que apresentam cultura positiva e manifestações de processos infecciosos (ANVISA, 2007, ARAÚJO, 2012).

A Anvisa, em parceria com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e com a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB/Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde tem instituído várias medidas para monitorar e controlar a resistência microbiana em serviços de saúde no país. Entre essas medidas, destacam-se a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) (OPAS; OMS/BRASIL, 2009); aprovação da Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº 44, de 2010 e subsequentemente da RDC nº 20, de 2011, que revogou a RDC nº 44/2010; Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados, entre outras (ANVISA, 2014c, BRASIL, 2010, 2011).



## 1.5 CORINEBACTÉRIAS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA

O gênero *Corynebacterium* pertence à classe *Actinobacteria* e representa um grupo diverso de bactérias Gram-positivas, com um alto conteúdo de G+C no DNA (variando de 51% a 63% mol.), possuindo parede celular composta por arabinose, galactose, ácido mesodiaminopimélico e cadeias curtas de ácido micólico (aproximadamente 22 a 36 átomos de carbono). Há evidências de heterogeneidade dentro do gênero, como exemplos, as espécies clinicamente relevantes *Corynebacterium amycolatum* e *Corynebacterium kroppenstedtii* carecem de ácidos micólicos na parede celular e *Corynebacterium afermentans* e *Corynebacterium auris* possuem acima de 65% de mol. de G+C no DNA (FUNKE et al, 1997, KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, FUNKE; BERNARD, 2011, OLENDER, 2012).

De acordo com a publicação mais recente da “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” (EUZEBY, 1997, PARTE, 2014), atualmente são 95 espécies descritas, nas quais aproximadamente 85 possuem importância médica, incluindo espécies patogênicas para animais, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium kutscheri*, *Corynebacterium canis*, além de um grande grupo de espécies que colonizam a pele e membranas mucosas dos seres humanos, que em circunstâncias favoráveis, podem causar infecções graves, como *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum*, *C. amycolatum*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (OLENDER, 2012). A espécie mais conhecida do gênero é o patógeno humano *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria, uma doença toxêmica de evolução aguda. Esse micro-organismo vem sendo isolado de infecções invasivas, como endocardite, sepsis, osteomielite, artrite, entre outras (JANDA, 1998a, SCHRODER et al, 2012, TORRES et al, 2013, PEIXOTO et al, 2014).

As corinebactérias (*coryne* = clava) são bactérias que tendem a ser claviformes quando expostas a meios artificiais de cultura. São não esporuladas, sendo afuniladas, sem flagelos e cápsulas. Formas cocobacilares também podem ser observadas, dependendo das condições e tempo de cultivo. O tamanho pode variar de 2 a 6 µm de comprimento e 0,5 a 1,1 µm de diâmetro. Devido à sua forma de divisão, ângulos agudos são formados conferindo o aspecto de letras chinesas

quando visualizadas em um esfregaço corado pelo método de Gram (JANDA, 1998a, RENOM et al, 2007, CHUNG et al, 2008, FUNKE; BERNARD, 2011).

A maioria das espécies são anaeróbias facultativas na sua necessidade de crescimento e apresentam metabolismo fermentativo de carboidratos. Algumas espécies requerem lipídios para o crescimento, esta necessidade é melhor demonstrada pelo reforçado crescimento no meio contendo 0,1-1% de Tween 80 em comparação com o meio sem o Tween 80 (JANDA, 1998a, KONEMAN, 2010).

As corinebactérias pertencerem à microbiota da pele e de mucosas e encontram-se amplamente disseminadas no meio ambiente. Tem sido crescente os relatos de casos de infecções humanas causadas por algumas espécies do gênero *Corynebacterium*, 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, MARTINS et al, 2009, FUNKE; BERNARD, 2011).

Com exceção de *C. diphtheriae*, a patogenicidade de outras corinebactérias de amostras clínicas tem sido subestimada por vários anos. O melhor reconhecimento taxonômico das corinebactérias em amostras clínicas e o aumento de relatos de casos associando-as com infecções em humanos e também em animais mudou esta visão nas últimas décadas. O desenvolvimento da resistência a múltiplas drogas provavelmente é reforçado pela pressão seletiva que ocorre no ambiente hospitalar e tem consequências para o sucesso do tratamento de infecções humanas, especialmente em indivíduos idosos e em pacientes imunodeprimidos. Bactérias multirresistentes reduzem a eficácia do tratamento e os enfermos permanecem infectados por mais tempo e, por sua vez, propicia a propagação destas às outras pessoas (OMS, 2012, SCHRODER et al, 2012).

As corinebactérias são responsáveis por cerca de 4 a 9% das endocardites após troca de prótese ou válvula. A mortalidade entre as endocardites causadas por corinebactérias é da ordem de 31%. Estimam-se que sejam responsáveis por

apenas 0,2-0,4% dos casos de endocardite de válvula nativa. Os fatores de risco reconhecidos para endocardite por *Corynebacterium* incluem doença cardíaca preexistente, histórico de endocardite bacteriana e a presença de dispositivos protéticos. Entretanto, na maioria dos laboratórios esses patógenos permanecem sendo descartados como meros contaminantes (KNOX; HOLME, 2002, BELMARES et al, 2007, GUERRERO et al, 2012, OLENDER, 2012).

Desde 1970, alguns autores discutem as infecções graves causadas por BGPI, a maioria delas associadas com quadros de bacteremia e endocardite em pacientes em estado de malignidade ou sob terapia com imunossupressores. Após décadas, muitas corinebactérias têm emergido como importantes patógenos causadores de várias infecções graves (PETIT et al, 1994, BALCI; EKSI; BAYRAM, 2002, OLENDER, 2012).

O aumento do número de pacientes imunocomprometidos e o uso de dispositivos invasivos tem elevado a importância clínica dos bacilos Gram-positivos em bacteremias, incluindo as causadas pelas corinebactérias. Sem a identificação correta do organismo, é difícil determinar qual antibiótico administrar. A vancomicina não é universalmente ativa contra bacilos Gram-positivos e os critérios de suscetibilidade não estão padronizados (CHUNG et al, 2008).

Dentre as principais espécies de relevância clínica, podem ser ressaltados os clones multirresistentes de *C. jeikeium*, *C. amycolatum* e *C. urealyticum* (RENOM et al, 2007). Recentemente, tem sido observado o aumento na resistência aos antimicrobianos nas espécies *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium xerosis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. striatum*, *Corynebacterium afermentans* e *Corynebacterium macginley* e variações geográficas na frequência de isolamento e na resistência natural e adquirida (SEWEEL et al, 1995, KNOX; HOLME, 2002, BELMARES et al, 2007, MARTINS et al, 2009, BAIO et al, 2013).

## 1.6 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Os micro-organismos não possuem características morfológicas suficientes que permitam a sua distinção, sendo assim os microbiologistas desenvolveram uma variedade de métodos que testam as reações metabólicas, determinam a

composição química de estruturas para definir características fenotípicas que possibilitam o agrupamento e identificação destes. Os procedimentos convencionais para identificação bacteriana nos laboratórios de microbiologia são baseados nas características fenotípicas. A primeira etapa para a identificação bacteriana é a obtenção de uma cultura pura. A determinação da reação de Gram e morfologia do isolado bacteriano são fundamentais para a realização da identificação fenotípica. Se houver algum erro na determinação da reação de Gram, os testes subsequentes podem ser conduzidos de forma equivocada resultando em uma identificação incorreta (SUTTON; CUNDELL, 2004, TORTORA; FUNKE; CASE et al, 2006, BAIIO, 2007). Contrastando com as provas convencionais que são dependentes de crescimento bacteriano para a determinação do resultado, os testes com substratos cromogênicos ou fluorogênicos detectam enzimas pré-formadas nas bactérias (BAIO, 2007).

Alguns testes automatizados ou semi-automatizados baseados em testes fenotípicos tem sido utilizados por laboratórios clínicos. Estes sistemas permitem identificar bactérias de relevância clínica mais rápido e corretamente (BOSSHARD et al, 2006). Esses sistemas foram desenvolvidos a partir da combinação de provas convencionais e enzimáticas com substratos cromogênicos, como por exemplo, os sistemas API e VITEK (bioMérieux). Nesses sistemas, diferentes conjuntos de substratos miniaturizados são utilizados e proporcionam resultados rápidos e permitem a identificação dos principais grupos bacterianos de importância clínica. Os perfis metabólicos obtidos são comparados com perfis estabelecidos no banco de dados (EIGNER et al, 2005).

O sistema semi-automatizado API está disponível como um conjunto de testes para identificação de leveduras e de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Apresenta-se como um sistema de testes bioquímicos combinados a um banco de dados, o *APIWEB* (BIOMÉRIEUX, 2013).

O VITEK é um sistema automatizado, usado na identificação de micro-organismos e em teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Este é constituído por um sistema de enchimento/selador de cartões, uma incubadora/leitora, um computador e uma impressora. Para a identificação microbiana são utilizados cartões projetados para identificação, que contem substratos bioquímicos desidratados, onde não é necessário nenhum reagente adicional. Apresenta um software que processa e interpreta os resultados. A identificação realizada pelo

VITEK 2 abrange mais de 300 espécies microbianas de importância clínica e algumas no campo industrial (BIOMÉRIEUX, 2009).

Esses sistemas compactos apresentam limitações, como por exemplo: i) Nem todas as cepas de uma espécie apresentam uma característica particular; ii) Algumas cepas podem apresentar resultados diferentes em testes repetidos; iii) Os bancos de dados são limitados ou a espécie pode não ter sido descrita; iv) Os resultados do teste baseiam-se na interpretação individual e experiência, sendo que pequenas alterações na execução do teste podem fornecer resultados falsos (BOSSHARD et al, 2004). Apesar dos problemas apresentados, diversos estudos demonstram que os sistemas compactos são confiáveis para identificação rápida de vários grupos de micro-organismos de origem clínica e assim possuem uma ampla aceitação (EIGNER et al, 2005, ALMUZARA et al, 2006, RENNIE et al, 2008).

As infecções por *Corynebacterium* são diagnosticadas convencionalmente por cultivo seguido por análises fenotípicas. No entanto, a confiabilidade da identificação fenotípica é limitada. A identificação das corinebactérias é um dos maiores desafios que os laboratórios clínicos enfrentam, devido principalmente a enorme diversidade destes micro-organismos e ao número relativamente pequeno de provas bioquímicas convencionais disponíveis para sua diferenciação. Alguns laboratórios consideram a maioria das corinebactérias como contaminantes de pele e as caracterizam como “difteróides” e/ou usam testes de identificação simplificados, que, no entanto, podem ter um alcance limitado (JANDA, 1998a, KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, ALMUZARA et al, 2006, CAMELLO et al, 2008). As espécies *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. xerosis* e *C. minutissimum* formam um grupo de corinebactérias comumente denominado “Complexo XSMA” e, com exceção de *C. xerosis*, são as espécies de *Corynebacterium* mais frequentemente isoladas de amostras clínicas. Esse grupo é dificilmente caracterizado pelos métodos fenotípicos convencionais uma vez que suas características são pouco distintas, necessitando assim de técnicas moleculares para realizar sua correta identificação (LETEK et al, 2006, DALAL; LIKHI, 2008). Até pouco tempo, acreditava-se que *C. xerosis* fosse a bactéria corineforme mais comum da pele. Hoje em dia, dados consideráveis indicam que os isolados clínicos de *C. xerosis* são, em sua maioria, *C. amycolatum* (CLARKE et al, 1999, FUNKE; BERNARD, 2011). Alguns autores recomendam alguns testes adicionais (**Tabela 1**) para diferenciação das espécies pertencentes ao “Complexo XSMA”, como a suscetibilidade ao agente vibriostático O/129,

fermentação da glicose a 20°C e 42°C e a hidrólise da tirosina (FUNKE et al, 1996; WAUTERS et al, 1998; FUNKE; BERNARD, 2011). (LETEK et al, 2006). Nos últimos anos, diversos métodos moleculares foram desenvolvidos para identificação precisa das espécies de *Corynebacterium*, como ARDRA-PCR (VANEECHOUTTE et al, 1995), sequenciamento dos genes 16S rRNA e do fragmento do gene *rpoB* (KHAMIS; RAOULT, LA SCOLA, 2004, KHAMIS et al, 2005); PCR multiplex para diferenciar as espécies toxinogênicas de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* (TORRES et al, 2013); RFLP-PCR para diferenciar *C. amycolatum* de *C. striatum* (SIERRA et al, 2005); PCR convencional e PCR em tempo real do gene *divIVA* (relacionado celular a divisão celular), para diferenciar *C. amycolatum* de outras espécies relacionadas; PCR em tempo real do gene polifosfato-quinase para diferenciar as principais corinebactérias isoladas de infecções de prótese articular (CAZANAVE et al, 2012).

**Tabela 1**

Testes complementares para a diferenciação de espécies pertencentes ao “Complexo XSMA”

Espécies	O/129	Glicose 20°C	Glicose 42°C	Hidrólise da tirosina
<i>C. xerosis</i>	S <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>	-
<i>C. striatum</i>	S	+	+	+
<i>C. minutissimum</i>	S	-	+	+ <sup>4</sup>
<i>C. amycolatum</i>	R <sup>5</sup>	-	+	-

<sup>1</sup> S: sensível; <sup>2</sup> + positivo; <sup>3</sup> - negativo; <sup>4</sup>: a maioria das estirpes hidrolisa a tirosina; <sup>5</sup> R: a maioria das estirpes é resistente ao composto vibriostático O/129.

## 1.7 IMPORTÂNCIA DE TÉCNICAS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE CORINEBACTÉRIAS

As modificações taxonômicas das corinebactérias são frequentes conforme aumenta o grau de conhecimento relativo às suas características fenotípicas e genotípicas, dificultando 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 (COYLE; LIPSKY, 1990, MISTRY et al, 2006, CAMELLO et al, 2008, FUNKE; BERNARD, 2011, OLENDER, 2012).

Apesar de poucos laboratórios disporem de recursos materiais e profissionais qualificados para a caracterização fenotípica e/ou genotípica de BGPI, particularmente nos países em desenvolvimento, estudos tem demonstrado a necessidade de metodologias moleculares para conclusão da identificação de corinebactérias. Como exemplo, podemos ressaltar o fato das espécies *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. xerosis* serem bioquimicamente relacionadas à espécie *C. amycolatum*, dificultando a diferenciação pelos testes fenotípicos (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, FUNKE; BERNARD, 2011).

A identificação bacteriana baseada em métodos moleculares surgiu como alternativa ou complemento para os procedimentos de identificação fenotípica (BOSSHARD et al, 2006). As metodologias envolvendo ácidos nucléicos revolucionaram a identificação e classificação dos micro-organismos. O sequenciamento da subunidade ribossomal 16S rRNA possibilitou um grande avanço na taxonomia bacteriana e passou a ser empregado na classificação de procariotos e em estudos filogenéticos (WOESE, 1987, WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990, ROSSELLÓ-MORA, 2005).

Em bactérias, os genes ribossomais são transcritos do operon ribossomal 30S, esta molécula é clivada pela enzima RNase III formando as subunidades 16S, 23S e 5S. O tamanho do operon ribossomal (*rrn*), a sequência nucleotídica e a estrutura secundária desses três genes ribossomais são conservados dentro das espécies bacterianas (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2010).

O gene 16S rRNA possui aproximadamente 1500 pares de bases e é composto de regiões variáveis e conservadas. Em geral, a comparação das sequências do gene 16S rRNA permite a diferenciação entre gêneros de organismos (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, BAIIO, 2007). Esta é a metodologia de escolha para determinação do gênero bacteriano (CLARRIDGE, 2004, PETTI, 2007).

A utilização do gene 16S rRNA para fins de identificação tem sido ampla, uma vez que este gene é universal para bactérias e uma grande quantidade de sequências deste gene está disponível em banco de dados de sequências de nucleotídeos permitindo assim a comparação das sequências de estirpes

bacterianas desconhecidas (CLARRIDGE, 2004, RIVAS et al, 2004, MIGNARD; FLANDROIS, 2006).

A presença de múltiplas cópias no operon ribossomal e sua heterogeneidade dentro do genoma são consideradas como fator limitante para o uso na identificação de espécies. O número de cópias do operon ribossomal no genoma bacteriano pode variar de 1 a 15. As sequências dessas múltiplas cópias são praticamente idênticas na maioria dos casos com 1-2% de divergência. Para espécies estreitamente relacionadas, somente o sequenciamento do gene 16S rRNA não é suficiente para diferenciação dessas espécies (SCHLEIFER, 2009). Além disso, espécies diferentes podem compartilhar identidade completa da sequência do gene 16S rRNA (SATOMI; LA DUC; VENKATESWARAN, 2006). Nestes casos, outros genes conservados (*housekeeping*) do genoma bacteriano podem realizar a discriminação das espécies estreitamente relacionadas (PETTI, 2007, RICHERT; BRAMBILLA; STACKEBRANDT, 2007).

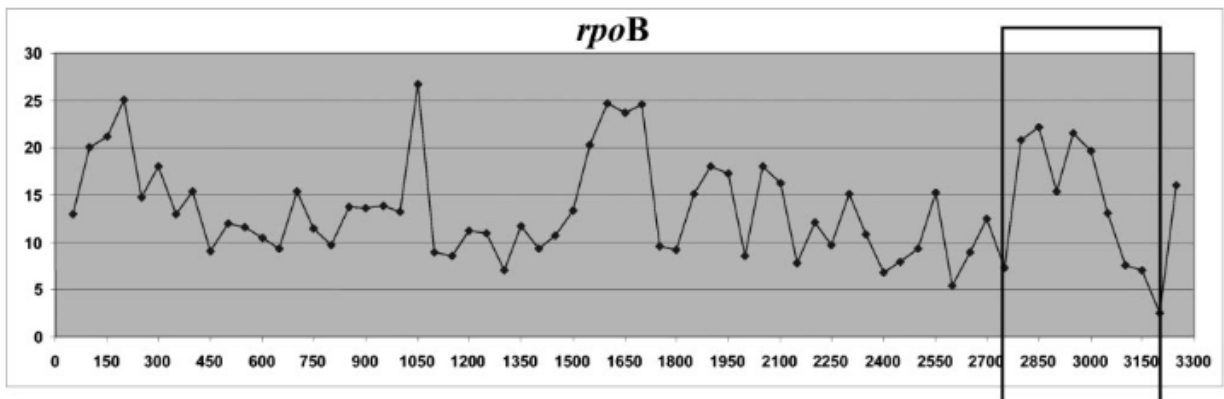
A análise de genes *housekeeping* (genes codificadores de enzimas essenciais para a manutenção da função celular) como o gene *rpoB* (codificador da subunidade beta da enzima RNA polimerase) serve como ferramenta complementar ao sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2010). O gene *rpoB* possui aproximadamente 3000 pb e é utilizado para a análise taxonômica e identificação bacteriana. Em estudos anteriores, o gene *rpoB* foi utilizado para estudar vários gêneros bacterianos, incluindo *Bartonella* spp., *Staphylococcus* spp., membros da família Enterobacteriaceae e *Mycobacterium* spp., por exemplo (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009).

Em 2004, Khamis, Raoult e La Scola estudaram a sequência do gene *rpoB* de espécies de *Corynebacterium* e determinaram as regiões de variabilidade delimitadas por regiões conservadas. Os pesquisadores desenharam primers universais para a amplificação de uma região pequena (aproximadamente 434-452 pb) mas discriminativa na identificação das espécies de *Corynebacterium* (**Figura 1**). Com base nos resultados obtidos a partir das análises das sequências do gene *rpoB* Khamis e colaboradores (2005), propuseram que dois isolados de *Corynebacterium* pertencem a mesma espécie se apresentarem acima de 95% de similaridade para este gene.



A introdução de métodos moleculares, incluindo a análise da sequência dos genes 16S rRNA e *rpoB* tem constituído uma forma de identificação confiável de espécies *Corynebacterium* (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, KHAMIS et al, 2005, VENEZIA et al, 2012, BERNARD et al, 2013). O gene *rpoB* emergiu como candidato para análises filogenéticas e identificação bacteriana, principalmente para micro-organismos estreitamente relacionados. Junto com o gene 16S rRNA, o gene *rpoB* pode ajudar a definir uma nova espécie ou subespécie (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009).

**Figura 1.** Representação gráfica das regiões de variabilidade (eixo y) no gene *rpoB* de *Corynebacterium*.



Fonte: (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA

O INCQS é uma unidade da Fiocruz que atua em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Age em estreita cooperação com a Anvisa e com Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, entre outros parceiros. Desta forma, o INCQS tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária.

É preocupante o aumento contínuo das taxas de mortalidade relacionadas a infecções por bactérias multirresistentes, em todos os continentes, isto por que as infecções por micro-organismos multirresistentes prolonga a duração da enfermidade, aumentando o risco de morte. Devido ao crescente número de indivíduos imunocomprometidos, tem ocorrido um aumento de relatos de infecções invasivas por corinebactérias que eram consideradas apenas como colonizadores do ambiente, da microbiota humana ou de animais. A aplicação das metodologias moleculares para a identificação de BGPI tem se tornado ferramenta fundamental para a identificação destas bactérias de origem clínica e ambiental, dada a dificuldade de identificação pelas metodologias convencionais e automatizadas baseadas em características fenotípicas. A caracterização genotípica é importante para avaliação das metodologias fenotípicas que são amplamente utilizadas nos laboratórios clínicos. A abordagem molecular tem sido ferramenta útil no diagnóstico de infecções causadas por micro-organismos fastidiosos ou aqueles que podem ser facilmente identificados erroneamente usando métodos de identificação fenotípica. Deste modo a utilização da análise das sequências do gene 16S rRNA e de outros genes conservados (*housekeeping*) para caracterizar os BGPI de origem clínica, proporcionarão resultados confiáveis nas identificações desses patógenos, auxiliando, portanto, na determinação de ações preventivas de riscos e danos a saúde da população.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

O presente trabalho tem como objetivo principal o isolamento, caracterização fenotípica e molecular de estirpes de corinebactérias isoladas de espécimes clínicos oriundos de sítios intravenosos, analisadas rotineiramente no Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) e no Laboratório de Bacteriologia (LABAC) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), no período de 2010 a 2013.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Realizar a caracterização fenotípica de bastonetes Gram-positivos e catalase-positivos sugestivos de corinebactérias utilizando métodos bioquímicos convencionais, sistemas comerciais API Coryne (bioMérieux) e VITEK 2 (bioMérieux);

Realizar a caracterização molecular de bastonetes Gram-positivos e catalase-positivos utilizando a metodologia da análise do gene 16S rRNA;

Realizar a caracterização molecular de estirpes relacionadas ao gênero *Corynebacterium* utilizando a metodologia da análise do gene *rpoB*;

Analisar comparativamente os resultados obtidos nas identificações das estirpes bacterianas pelas duas metodologias fenotípica e genotípica;

Determinar os perfis de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por micro-organismos Gram-positivos;

Determinar as espécies de corinebactérias e a presença de cepas multirresistentes encontradas nos sítios intravenosos;

Correlacionar as espécies de corinebactérias caracterizadas genotipicamente com as unidades hospitalares e os sítios de isolamento.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ESTIRPES BACTERIANAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Neste estudo foram analisadas 60 estirpes bacterianas de bastonetes e/ou coco-bacilos Gram-positivos irregulares sugestivas de corinebactérias, isoladas de sítios intravenosos durante o período de 2010 a 2013 (**Tabela 2**), pertencentes às coleções de culturas do LDCIC/UERJ. Deste total, 5 estirpes foram oriundas de outras instituições hospitalares. Tais estirpes foram encaminhadas ao LDCIC/UERJ, que atua como Centro Colaborador da Difteria e Corinebactioses. Estas amostras foram estocadas a -20° C e -80° C em Skim milk (Difco) contendo 10% de glicerol e à temperatura ambiente em meio de Cystine Tryptone Ágar (CTA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética aprovado sob o n° 01247512.3.0000.5259, versão 2/HUPE/UERJ.

**Tabela 2**

Dados das 60 estirpes bacterianas utilizadas neste estudo

Estirpe	Mês e Ano isolamento	Unidade Hospitalar <sup>1</sup>	Sexo/Idade <sup>2</sup>	Sítio	Bactéria associada <sup>3</sup>
2080	03/2010	Hemodiálise/HUPE	M/41	Sangue	<i>Staphylococcus</i> sp.
2089	04/2010	CTI Geral/HUPE	M/64	Pta. de cateter	Não
2091	04/2010	DIP/HUPE	F/40	Sangue	<i>Acinetobacter</i> sp.
2092	04/2010	CTI Geral/HUPE	M/NI	Sangue	NI
2103	05/2010	DIP/HUPE	F/NI	Pta. de cateter	Não
2111	05/2010	Hosp. das Laranjeiras	M/27	Sangue	Não
2124	08/2010	Dermatologia/HUPE	F/30	Sangue	SCN e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2125 A	08/2010	Enf. NI/HUPE	F/61	Sangue	Não
2130	08/2010	Dermatologia/HUPE	F/30	Sangue	Não
2219	01/2011	UI Clínica/HUPE	M/85	Sangue	Não
2228	02/2011	Un. coronariana/HUPE	F/92	Sangue	Não
2230	02/2011	UI Clínica/HUPE	M/56	Sangue	Não
2237	03/2011	UI Clínica/HUPE	M/56	Sangue	Não
2243	03/2011	AMI/HUPE	F/NI	Sangue	Não
2244	03/2011	CTI Geral/HUPE	M/69	Pta. de cateter	Não

**Tabela 2 (continuação)**

Dados das 60 estirpes bacterianas utilizadas neste estudo

<b>Estirpe</b>	<b>Mês e Ano isolamento</b>	<b>Unidade Hospitalar<sup>1</sup></b>	<b>Sexo/Idade<sup>2</sup></b>	<b>Sítio</b>	<b>Bactéria associada<sup>3</sup></b>
2245	03/2011	CTI Geral/HUPE	M/78	Pta.de cateter	Não
2248	04/2011	Plantão Geral/HUPE	F/15	Sangue	Não
2255	04/2011	Enf. 18/HUPE	F/62	Pta. de cateter	Não
2260	04/2011	Un. coronariana/HUPE	M/77	Sangue	Não
2263	05/2011	Enf. 15/HUPE	F/NI	Sangue	NI
2273	05/2011	Hematologia/HUPE	M/58	Sangue	Não
2282	06/2011	Enf. 12/HUPE	F/77	Sangue	Não
2285	06/2011	CTI/HUPE	F/36	Cateter venoso	Não
2287 A	06/2011	Enf. 12/HUPE	F/NI	Sangue	NI
2287 B	06/2011	Enf. 12/HUPE	F/NI	Sangue	NI
2296	07/2011	Hosp. Mun. De Jesus	M/NI	Cateter venoso	NI
2297	07/2011	Hosp. Cardoso Fontes-	M/62	Sangue	Não
2298	07/2011	Hosp. Cardoso Fontes-	F/58	Sangue	Não
2305	08/2011	Cardiologia/HUPE	M/77	Pta. de cateter	SCN
2308	08/2011	Hematologia/HUPE	M/NI	Sangue	Não
2314	08/2011	CTI Geral/HUPE	F/75	Sangue	Não
2316	08/2011	Ortopedia/HUPE	M/17	Sangue	SCN
2324	10/11	Pneumologia/HUPE	F/73	Cateter	SCN
2325	10/11	CTI Geral/HUPE	M/70	Pta. de cateter	Não
2346	01/12	Enf. 17/HUPE	M/70	Sangue	SCN (MRS)
2354	02/2012	Enf. 17/HUPE	M/32	Sangue	Não
2369	03/12	Nefrologia/HUPE	M/23	Swab de orifício de cateter	Não
2372	04/2012	Nefrologia/HUPE	F/45	Sangue	Não
2376	04/2012	UTI Neonatal/HUPE	F/3meses	Pta. de cateter	Não
2385	05/2012	Hematologia/HUPE	M/16	Sangue	Não
2387	05/2012	Hematologia/HUPE	M/51	Sangue	Não
2390	05/2012	UCIPG/HUPE	F/63	Pta. de cateter	Não
2401	06/2012	Cir. Torácica/HUPE	M/62	Sangue	Não
2404	06/2012	Urologia/HUPE	M/75	Pta. de cateter	<i>Escherichia coli</i> / SCN
2407	06/2012	Lacen Noel Nuttels	NI/NI	Sangue	Não
2422	08/2012	Plantão Geral/HUPE	M/59	Sangue	SCN
2425	08/2012	Hematologia/HUPE	F/10	Sangue	Não
2430	09/2012	Obstetrícia/HUPE	F/19	Sangue	<i>Staphylococcus aureus</i>
2431	09/2012	Plantão geral/HUPE	M/74	Sangue	Não
2432	09/2012	Pediatria/HUPE	F/10	Sangue	Não

**Tabela 2 (continuação)**

Dados das 60 estirpes bacterianas utilizadas neste estudo

Estirpe	Mês e Ano isolamento	Unidade Hospitalar <sup>1</sup>	Sexo/Idade <sup>2</sup>	Sítio	Bactéria associada <sup>3</sup>
2439	11/2012	UCIPG/HUPE	M/83	Pta. de cateter	Não
2440	11/2012	Neurologia/HUPE	M/80	Pta. de cateter	SCN
2441	11/2012	UCIPG/HUPE	M/64	Sangue	Não
2443 A	12/2012	CTI Geral/HUPE	F/78	Pta. de cateter	Não
2443 B	12/2012	CTI Geral/HUPE	F/78	Pta. de cateter	Não
2444	12/2012	DIP/HUPE	M/27	Pta. de cateter	SCN (MRS)
2451	01/2013	Ginecologia/HUPE	F/85	Sangue	Não
2454	02/2013	UCIPG/HUPE	F/57	Pta. de cateter	SCN/ <i>Klebsiella pneumoniae</i>
2459	03/2013	Enf. 15/HUPE	F/41	Pta. de cateter	Não
2477	05/2013	Inst. Nac. de Cardiologia-	M/41	Sangue	Não
2509	08/2013	CTI Geral/HUPE	M/54	Sangue	Não
7057	09/2012	Un. Coronariana/HUPE	F/60	Sangue	Não
7058	09/2012	Un. Coronariana/HUPE	F/60	Sangue	Não
7059	09/2012	Un. Coronariana/HUPE	F/60	Sangue	Não
7060	09/2012	Un. Coronariana/HUPE	F/60	Sangue	Não

<sup>1</sup> AMI: Ambulatório; Cir. Torácica: Cirurgia Torácica; CTI: Centro de Terapia Intensiva; DIP: Doenças Infecto-Parasitárias; Enf: Enfermaria; Hosp.: Hospital; Inst. Instituto; Lacen: Laboratório Central; Mun. Municipal; Nac.: Nacional; UCIPG: Unidade Clínica Intermediária do Plantão Geral; Un. Coronariana: Unidade Coronariana; UI: Unidade Intermediária; <sup>2</sup> F: feminino; M: masculino; <sup>3</sup> MRS: *Staphylococcus* metilicina-resistente; SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativa.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

As estirpes bacterianas foram cultivadas em ágar sangue (Columbia Agar Base acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro) por 24h a 48h e submetidas à coloração de Gram, caracterização da morfologia colonial, teste da catalase e provas bioquímicas convencionais, além dos sistemas comerciais API Coryne (bioMérieux, France) e VITEK 2 (bioMérieux, France).

#### 4.2.1 Provas bioquímicas convencionais

Todas as estirpes foram submetidas à identificação pelos testes bioquímicos convencionais. Foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: hidrólises da esculina e ureia, redução de nitrato, metabolização dos carboidratos em meio de CTA contendo 1% da solução dos seguintes açúcares: glicose, maltose, sacarose, ribose, frutose, xilose, manose, arabinose, trealose, galactose e manitol; atividades de DNase, gelatinase e pesquisa de fator CAMP (JANDA, 1998a; CAMELLO, 2008; KONEMAN, 2010; FUNKE; BERNARD, 2011). Para as estirpes bacterianas pertencentes ao Complexo XSMA (formado pelas espécies *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. amycolatum*) foram realizados os seguintes testes adicionais: suscetibilidade ao agente vibriostático O/129 (150 µg/disco - 2,4-diamino-6,7-disopropylpeptidine) (Oxoid), hidrólise da tirosina e fermentação da glicose a 20°C e 42°C (WAUTERS et al, 1998, ALMUZARA et al, 2006, FUNKE; BERNARD, 2011).

#### 4.2.2 Sistema API Coryne

Todas as estirpes bacterianas foram submetidas à identificação pelo sistema API Coryne (REF 20900, bioMérieux, France). Para a preparação da galeria foi adicionada água destilada (aproximadamente 5 mL) nos alvéolos da caixa de incubação para criar uma atmosfera úmida. A galeria foi retirada da embalagem e colocada na caixa de incubação identificada. O inóculo foi preparado a partir de uma cultura pura de cada estirpe, semeada em ágar sangue, com crescimento de 24-48 horas a 37°C. Foi preparada uma suspensão bacteriana equivalente ou superior a escala 6 de McFarland na ampola *API Suspension medium*, composta de água desmineralizada. Posteriormente esta suspensão foi distribuída nos substratos NIT (nitrato) a GEL (gelatina). Cerca de 0,5 mL desta suspensão foi inoculada na ampola *API GP Medium* contendo meio enriquecido (composição: L-Cistina, Triptona bovina, cloreto de sódio, sulfito de sódio, vermelho de fenol, água desmineralizada e pH 7.4-7.8) e homogeneizada bem, na qual foi distribuída nos substratos O (oxidativo) a GLYG (glicogênio). Nos substratos URE (urease), O a GLYG foi adicionado óleo

mineral estéril para criar uma condição de anaerobiose. A caixa de incubação foi fechada e incubada a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação foi adicionada uma gota dos seguintes reagentes abaixo nos respectivos substratos e a leitura realizada após 10 minutos:

- Substratos NIT (Redução de nitrato a nitrito): Reagentes NIT1 e NIT2
- Substrato PYZ (pyrazinamidase): Reagente PYZ
- Substratos PyrA (pyrrolidonil arilamidase); PAL (fosfatase alcalina);  $\beta$ GUR (beta-glucuronidase);  $\beta$ GAL (beta-galactosidase);  $\alpha$ GLU (alfa-glucosidase);  $\beta$ NAG (N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase): Reagentes ZYM A e ZYM B

Após a leitura das provas enzimáticas a galeria de testes foi incubada por mais 24h e foi realizada a leitura definitiva das demais provas bioquímicas. A prova da catalase foi realizada utilizando uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% nos substratos ESC (esculina) ou GEL (gelatina). O resultado positivo ou negativo atribuído a cada substrato na ficha de resultado, foi observado através da mudança de coloração do substrato segundo a bula API Coryne. A identificação foi obtida a partir da comparação do perfil numérico ao sistema de identificação online *apiweb*.

#### 4.2.3 Sistema VITEK 2

Todas as estirpes foram submetidas à identificação pelo sistema VITEK 2. O cartão utilizado para identificação foi o ANC (*Anaerobe and Corynebacterium*), com exceção das estirpes 7057 a 7060 (não produtoras da enzima catalase), onde o cartão GP (*Gram Positive*) foi utilizado. No cassete com os tubos VITEK foram adicionados 3 mL de solução salina do VITEK 2 a 0,45% para preparação do inóculo. Antes do preparo o *Densichec Plus* (fotocolorímetro) foi calibrado utilizando a solução salina pura e as escalas 0, 0.5, 2 e 3 de McFarland. As estirpes bacterianas foram cultivadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 24-48 horas. Uma suspensão homogênea foi preparada a partir dessa cultura e a turvação ajustada para 2,7-3,3 da escala de McFarland pelo *Densichec Plus*. Os cartões foram abertos e colocados no cassete, de forma que o canudo do cartão ficasse



dentro do inóculo. O cassete foi então levado a câmara de vácuo no aparelho VITEK 2. Posteriormente, o cassete foi transferido para a segunda câmara para leitura. Após a leitura do código de barras dos cartões, esses foram identificados no computador e os resultados obtidos após 5-6 horas.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

#### 4.3.1 Extração do DNA Total

As estirpes bacterianas foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 24-48 horas. Alíquotas de 2 mL de cultura de cada estirpe 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) e submetida a banho-maria fervente (100°C) por 15 min. Após esta etapa, a suspensão foi imediatamente congelada a -20°C. Este material foi posteriormente descongelado e centrifugado (14000 rpm por 15 segundos). O sobrenadante transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C e posteriormente utilizado na reação da reação em cadeia pela polimerase (BAIO et al, 2013).

#### 4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação dos genes 16S rRNA e *rpoB* do genoma das estirpes bacterianas, 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<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP] 10mM), 100 ng de cada iniciador (**Tabela 3**), 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 (WATTS et al, 2000, KHAMIS et al, 2005, BAIIO et al, 2013).

**Tabela 3**

Iniciadores utilizados para as reações de amplificação e sequenciamento dos genes conservados

Gene	Fragmento (pb)	Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Referência
16S rRNA	1500	PA <sup>a,s</sup>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Watts et al, 2000
		PH <sup>a,s</sup>	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	Watts et al, 2000
		519R <sup>s</sup>	GTATTACCGCGGCGGCTG	Jonhson, 1994
		1242F <sup>s</sup>	CACACGTGCTACAATGG	Jonhson, 1994
		1831 <sup>s</sup>	GAGGAACACCGATGGCGAAGG	Watts et al, 2000
		1832 <sup>s</sup>	GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	Watts et al, 2000
<i>rpoB</i>	400	2700F <sup>a,s</sup>	CGWATGAACATYGGBCAGGT	Khamis et al, 2004
		3130R <sup>a,s</sup>	TCCATYTCRCCRAARCGCTG	Khamis et al, 2004

<sup>a</sup> amplificação; <sup>s</sup> sequenciamento

#### 4.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Os géis de agarose foram preparados a 2% dissolvendo a agarose ultrapura (Invitrogen) em tampão TAE 1X (Bio-Rad). 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 volts 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). Para os produtos purificados foram aplicados 2 µl do DNA purificado com 1 µl do tampão de corrida (Invitrogen) e 2 µl do marcador de massa molecular (Invitrogen) nos poços.

#### 4.3.4 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. No protocolo sugerido pelo fabricante os reagentes deveriam ser diluídos com isopropanol, contudo esse diluente foi substituído por etanol absoluto (Merck). Para purificação dos produtos de PCR com bandas inespecíficas foi empregado o E-gel (Invitrogen), um sistema de eletroforese em gel de agarose corado com SYBR Safe. Utilizou-se o gel CloneWell 0,8% (Invitrogen), o protocolo foi seguido conforme as instruções do fabricante.

#### 4.3.5 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) conforme as recomendações dos fabricantes. Posteriormente os produtos desta reação foram precipitados com 80 µl de uma solução com 75% de isopropanol, centrifugados 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 àquelas depositadas no banco de sequências GeneBank e Ribosomal Database Project II (RDP-II).

#### 4.4 SUSCETIBILIDADE AOS DIVERSOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

A partir de uma cultura pura de cada estirpe, uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland em salina a 0,85% foi preparada. O método utilizado foi o teste de difusão em ágar no meio de ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubado a 37°C por 24 horas. Para as estirpes com crescimento lento, a leitura final foi realizada com 48 horas. Os micro-organismos foram submetidos aos seguintes antimicrobianos (Oxoid), indicados rotineiramente nas infecções por micro-organismos Gram-positivos: penicilina G 10U (PEN), tetraciclina 30 µg (TET), ampicilina 10 µg (AMP), rifampicina 5 µg (RIF), gentamicina 10 µg (GEN), linezolida 30 µg (LZD), cefotaxima 30 µg (CTX), imipenem 10 µg (IPM), ciprofloxacina 5 µg (CIP), eritromicina 15 µg (ERI), clindamicina 2 µg (CLI), vancomicina 30 µg (VAN) e trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg (SXT). Como ainda não há um padrão definido para interpretação desses resultados, foi utilizada a tabela M-45 do CLSI 2007. Para as cepas suscetíveis foram usados os pontos de corte sugeridos para bactérias excluídas da tabela 2A a 2K. Para penicilina e ampicilina foram utilizados os pontos de corte para *Staphylococcus* e para os demais agentes antimicrobianos, o ponto de corte para outros micro-organismos que não *Haemophilus* sp. e *Neisseria gonorrhoeae* (MARTINEZ-MARTINEZ, 1994, CAMELLO et al, 2002, CLSI, 2007b, MARTINS et al, 2009).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

#### 5.1.1 Testes bioquímicos convencionais

Todas as 60 estirpes foram submetidas à caracterização morfo-tintorial pela coloração de Gram, sendo todas caracterizadas como bastonetes ou coco-bacilos Gram positivos. A produção da enzima catalase só não foi observada nas estirpes 7057 a 7060. Devido às características intrínsecas de tais estirpes, estas não foram submetidas aos testes bioquímicos convencionais por não ter sido possível obter crescimento bacteriano suficiente. Portanto, não foram incluídas nas avaliações pelas 3 metodologias fenotípicas.

Os resultados da caracterização bioquímica de 56 estirpes estão apresentados na **Tabela 4**. Acima da numeração de todas as estirpes estão a identificação genotípica. A última coluna traz o resultado da identificação fenotípica convencional. Todas as estirpes cresceram em ambiente aeróbio e nenhuma hidrolisou a esculina ou fermentou os carboidratos xilose e arabinose. Os demais testes bioquímicos apresentaram resultados variáveis para as estirpes avaliadas.

As análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* foram utilizadas como metodologias de referência para avaliação da identificação das estirpes utilizando a caracterização fenotípica convencional. A metodologia fenotípica convencional identificou corretamente o gênero de 43 (76,79%) estirpes. Duas (3,57%) estirpes foram identificadas como corineformes (2314 e 2385) (**Tabela 4**). Sete (12,5%) estirpes não foram identificadas e 4 (7,14%) tiveram a identificação do gênero equivocada (**Figura 2**). Com relação à identificação do gênero *Corynebacterium*, as espécies de *C. urealyticum*, *C. minutissimum* e *C. diphtheriae* foram identificadas corretamente. Das 4 estirpes de *C. jeikeium*, uma não foi identificada e 3 foram identificadas corretamente. Para as espécies de *C. amycolatum* e *C. striatum*, apenas 4 (26,66%) e 9 (42,86%) estirpes foram identificadas corretamente quanto à espécie, respectivamente (**Figura 3**).

Os resultados da hidrólise da tirosina, fermentação da glicose a 20°C e 42°C e suscetibilidade ao O/129 utilizados para a diferenciação de amostras pertencentes ao Complexo XSMA estão apresentados nas **Tabelas 5 e 6**. A estirpe de *C. minutissimum* (2422), também pertencente ao Complexo XSMA, apresentou os seguintes resultados: hidrólise da tirosina positiva, não fermentou a glicose a 20°C e 42°C e foi suscetível ao O/129.

### 5.1.2 Sistema API Coryne

A identificação pelo sistema semi-automatizado API Coryne é feita por um perfil numérico que é comparado ao banco de dados fornecendo um resultado com maior probabilidade. Segundo o critério de identificação recomendado pelo *APIWEB*, as 56 estirpes avaliadas apresentaram os seguintes resultados: 9 (16,7%), excelente identificação do gênero; 5 (8,83%), muito boa identificação; 14 (25%), boa identificação do gênero; 7 (12,5%), fraca discriminação; 4 (7,14%), perfil duvidoso; 15 (26,79%), identificação aceitável e 2 (3,57%), identificação incorreta (**Figura 4**).

Os resultados obtidos pelo sistema API Coryne foram também avaliados em paralelo com a identificação obtida pelas análises do sequenciamento de genes (**Tabela 7**). Assim, das 56 estirpes avaliadas pelo sistema API Coryne, 48 (85,70%) foram identificadas corretamente quanto ao gênero e 6 (10,7%) foram identificadas incorretamente quanto ao gênero. Para as estirpes 2387 e 2509 (3,6%), o sistema API Coryne indicou a possibilidade de dois gêneros, sendo um destes o gênero correto (**Figura 5**). Com relação à identificação do gênero *Corynebacterium*, as espécies de *C. urealyticum* e *C. diphtheriae* foram identificadas corretamente. Das 4 estirpes de *C. jeikeium*, 3 foram identificadas corretamente e para uma estirpe o sistema API Coryne indicou a possibilidade de dois gêneros (*Corynebacterium/Turicella*). Para as espécies de *C. amycolatum* e *C. striatum*, 8 (53,33%) e 16 (76,19%) das estirpes foram identificadas como *C. striatum/C. amycolatum*, respectivamente (**Figura 6**).

As estirpes 7057 a 7060 foram identificadas como *Erysipelothrix rhusiopathiae* utilizando o sistema API Coryne (**Tabela 7**).

Tabela 4

Resultados dos testes bioquímicos convencionais.

Estirpe	Testes bioquímicos <sup>1</sup>														Identificação fenotípica			
	Esc	NO <sub>3</sub>	Ure	Gli	Mal	Sac	Man	Mtl	Ter	Xil	Ara	Rib	Fru	Gal		DNase	CAMP	Gel
<b><i>Arthrobacter albus/comunsii</i></b>																		
2248	- <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>3</sup>	<i>C. afermentans</i>
<b><i>Brevibacterium casei</i></b>																		
2092	-	F <sup>4</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	NI <sup>5</sup>
2314	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	Corineforme
<b><i>Brevibacterium celere/sanguinis</i></b>																		
2080	-	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NI
2385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Corineforme
<b><i>Brevibacterium massiliense/ravenspurgense</i></b>																		
2219	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
2346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>C. afermentans</i>
2451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NI
<b><i>Corynebacterium amycolatum</i></b>																		
2124	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>C. minutissimum</i>
2125 A	-	F	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Complexo XSMA
2244	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Corynebacterium propinquum</i>
2255	-	-	-	F	F	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	<i>C. amycolatum</i>
2263	-	-	-	+	F	F	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>C. minutissimum</i>
2282	-	+	-	F	F	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	Complexo XSMA
2287 A	-	+	-	F	F	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	Complexo XSMA
2298	-	-	-	F	F	F	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
2305	-	-	-	F	F	-	-	-	-	-	-	F	F	-	-	-	-	Complexo XSMA
2354	-	-	-	+	F	F	F	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
2369	-	+	-	+	+	-	F	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	<i>C. amycolatum</i>
2404	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Complexo XSMA

**Tabela 4 (continuação)**

Resultados dos testes bioquímicos convencionais.

Estirpe	Testes bioquímicos																	Identificação fenotípica
	Esc	NO <sub>3</sub>	Ure	Gli	Mal	Sac	Man	Mtl	Tre	Xil	Ara	Rib	Fru	Gal	DNase	CAMP	Gel	
<b><i>Corynebacterium amycolatum</i></b>																		
2407	-	-	-	F	F	-	F	-	F	-	-	F	F	-	-	-	-	Complexo XSMA
2443 A	-	-	-	F	F	-	F	NR <sup>6</sup>	-	-	-	F	F	-	-	-	-	<i>C. amycolatum</i>
2459	-	+	-	+	F	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	<i>C. amycolatum</i>
<b><i>Corynebacterium diphtheriae</i></b>																		
2111/HC06	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	<i>C. diphtheriae</i>
2477/HC07	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	NR	+	+	-	+	-	-	<i>C. diphtheriae</i>
<b><i>Corynebacterium jeikeium</i></b>																		
2325	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>C. jeikeium</i>
2443 B	-	-	-	F	-	-	-	NR	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	<i>C. jeikeium</i>
2444	-	-	-	F	-	-	-	NR	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	<i>C. jeikeium</i>
2509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NI
<b><i>Corynebacterium minutissimum</i></b>																		
2422	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	F	-	-	<i>C. minutissimum</i>
<b><i>Corynebacterium simulans</i></b>																		
2273	-	+	-	+	-	F	F	-	-	-	-	-	F	-	-	+	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
<b><i>Corynebacterium striatum</i></b>																		
2089	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	NI
2091	-	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	NI
2103	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	NI
2130	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	<i>C. macginley</i>
2228	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	Complexo XSMA
2230	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Corynebacterium argentoratense</i>
2237	-	-	-	+	-	+	+	-	-	NR	-	NR	+	NR	-	+	-	<i>C. striatum</i>
2243	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	F	-	+	-	<i>C. striatum</i>
2245	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	Complexo XSMA



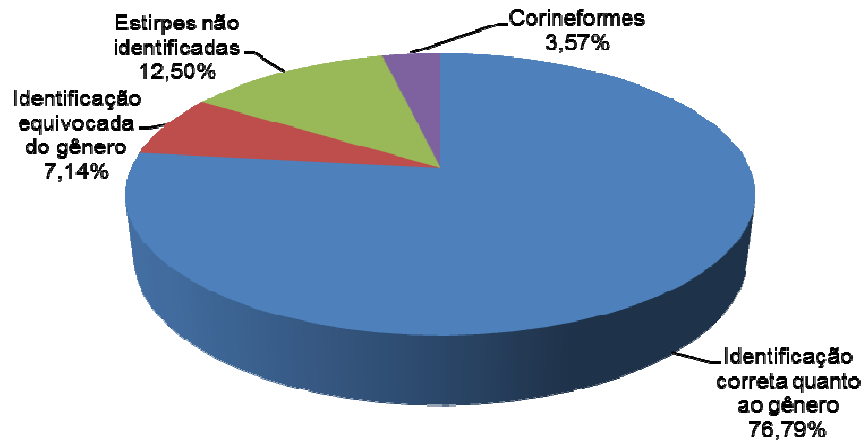
**Tabela 4 (continuação)**

Resultados dos testes bioquímicos convencionais.

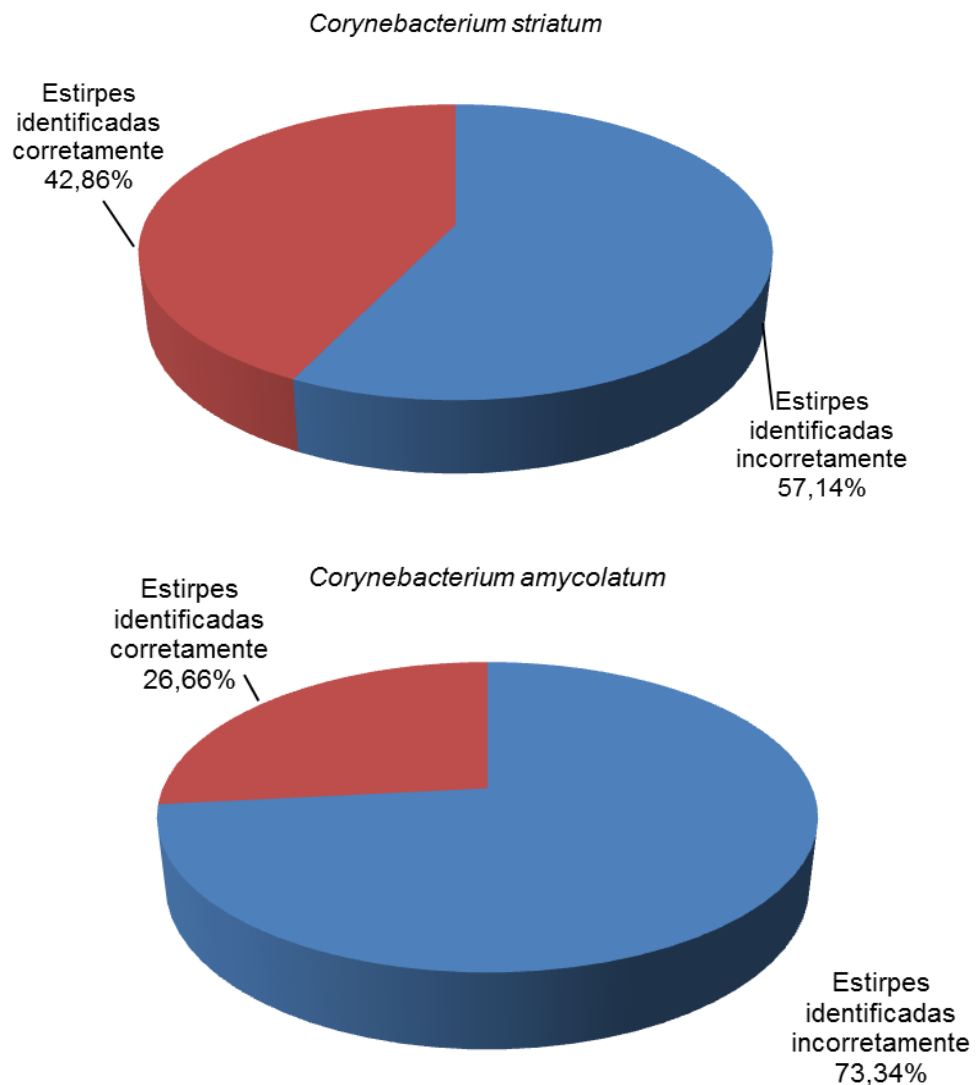
Estirpe	Testes bioquímicos																	Identificação fenotípica
	Esc	NO <sub>3</sub>	Ure	Gli	Mal	Sac	Man	Mtl	Tre	Xil	Ara	Rib	Fru	Gal	DNase	CAMP	Gel	
<b><i>Corynebacterium striatum</i></b>																		
2285	-	-	-	+	-	F	F	-	-	-	-	-	F	+	-	-	-	Complexo XSMA
2296	-	-	-	+	-	+	F	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	<i>C. striatum</i>
2308	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	F	-	<i>C. striatum</i>
2316	-	-	-	+	-	F	+	-	-	-	-	-	F	+	-	+	-	<i>C. striatum</i>
2324	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	NR	<i>C. striatum</i>
2376	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	Complexo XSMA
2390	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	Complexo XSMA
2401	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>C. argentoratense</i>
2425	-	F	-	+	-	+	F	-	-	-	-	-	+	F	-	-	-	Complexo XSMA
2432	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	NR	NR	NR	-	-	+	-	<i>C. striatum</i>
2439	-	-	-	+	-	+	+	NR	-	-	-	-	F	+	-	+	-	<i>C. striatum</i>
2454	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>C. striatum</i>
<b><i>Corynebacterium urealyticum</i></b>																		
2260	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>C. urealyticum</i>
2287 B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>C. urealyticum</i>
2431	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>C. urealyticum</i>
<b><i>Microbacterium oxydans/paraoxydans/liquefaciens</i></b>																		
2387	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	NR	-	-	-	+	-	-	<i>Leifsonia aquatica</i>

<sup>1</sup> Ara (arabinose); CAMP: pesquisa de fator CAMP; DNase: produção da enzima desoxirribunuclease; ESC: hidrólise da esculina; Fru (frutose); Gal (galactose); Gel: hidrólise da gelatina; Gli (glicose); Mal (maltose); Man (manose); Mtl (manitol); NO<sub>3</sub>: redução do nitrato a nitrito; Rib (ribose); Sac (sacarose); Tre (trealose); URE: hidrólise da uréia; Xil (xilose); <sup>2</sup> - negativo; <sup>3</sup> + positivo; <sup>4</sup> F: fraca positiva; <sup>5</sup> NI: não identificada; <sup>6</sup> NR: não realizado.

**Figura 2.** Avaliação da identificação fenotípica convencional quanto ao gênero em comparação com a metodologia de referência.



**Figura 3.** Avaliação da identificação fenotípica convencional para as espécies *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium amycolatum* em comparação com a metodologia de referência.



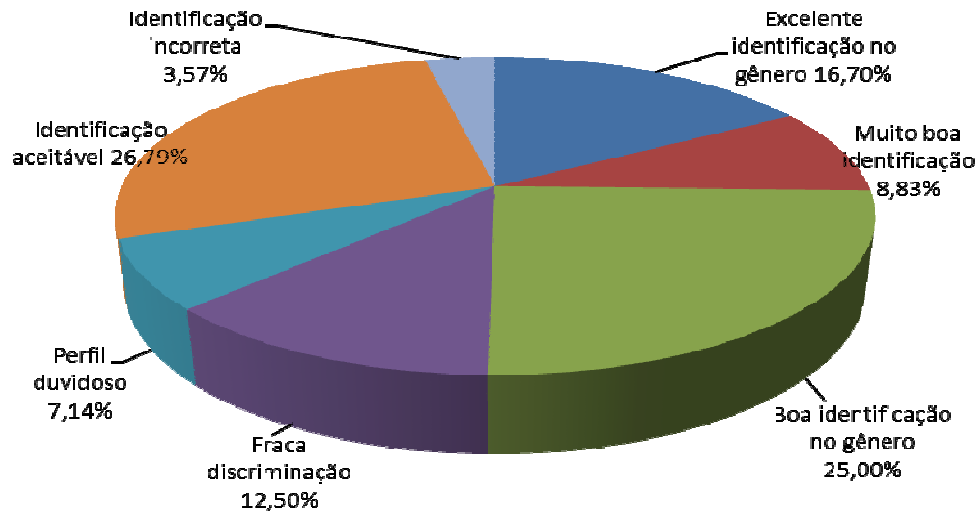
**Tabela 5**Testes complementares para as estirpes de *Corynebacterium striatum*.

Estirpes	Suscetibilidade ao O/129	Hidrólise da tirosina	Fermentação da glicose 20°C	Fermentação da glicose 42°C
2089	NR <sup>1</sup>	NR	NR	NR
2091	NR	NR	NR	NR
2103	NR	NR	NR	NR
2130	S <sup>2</sup>	NR	NR	NR
2228	S	+ <sup>3</sup>	+	- <sup>4</sup>
2230	S	-	+	+
2237	S	-	+	+
2243	S	+	+	+
2245	S	+	+	-
2285	S	+	+	-
2296	S	+	+	+
2308	S	+	+	-
2316	S	+	+	+
2324	S	+	+	-
2376	S	+	-	-
2390	S	+	+	-
2401	S	-	+	-
2425	S	-	+	-
2432	S	-	NR	-
2439	S	+	+	-
2454	S	-	+	+

<sup>1</sup> NT: não realizado; <sup>2</sup> S: sensível; <sup>3</sup> + positivo; <sup>4</sup> - negativo.**Tabela 6**Testes complementares para as estirpes de *Corynebacterium amycolatum*.

Estirpes	Suscetibilidade ao O/129	Hidrólise da tirosina	Fermentação da glicose 20°C	Fermentação da glicose 42°C
2124	S <sup>1</sup>	NR <sup>2</sup>	NR	NR
2125 A	S	NR	NR	NR
2244	S	NR	NR	NR
2255	R <sup>3</sup>	- <sup>4</sup>	-	-
2263	S	NR	NR	NR
2282	R	NR	-	-
2287 A	R	-	-	-
2298	R	-	+ <sup>5</sup>	+
2305	S	-	-	-
2354	R	NR	-	+
2369	R	-	-	-
2404	S	-	-	-
2407	S	-	-	+
2443 A	R	-	+	NR
2459	R	-	-	+

<sup>1</sup> S: sensível; <sup>2</sup> NR: não realizado; <sup>3</sup> R: resistente; <sup>4</sup> - negativo; <sup>5</sup> + positivo;.

**Figura 4.** Identificação baseada nos critérios do sistema API Coryne.**Tabela 7**

Comparação dos resultados obtidos pelo sistema semi-automatizado API Coryne com os obtidos pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

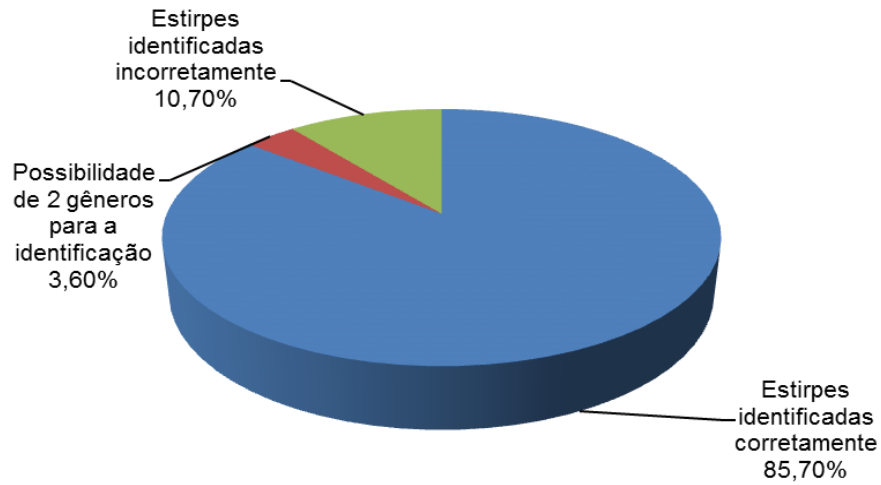
Estirpe	API Coryne	%	Observação gerada pelo API Coryne	Identificação genotípica
2080	<i>Rhodococcus</i> spp.	94	Fraca discriminação	<i>B. sanguinis/celere</i>
2089	<i>C. striatum/amycolatum</i>	64	Perfil duvidoso	<i>C. striatum</i>
2091	<i>C. striatum/amycolatum</i>	73	Perfil duvidoso	<i>C. striatum</i>
2092	<i>Brevibacterium</i> spp.	66	Fraca discriminação	<i>B. casei</i>
2103	<i>C. argentoratense</i>	79	Boa identificação no gênero	<i>C. striatum</i>
2111 (HC06)	<i>C. diphtheriae</i> biotipo <i>gravis</i>	98	Boa identificação	<i>C. diphtheriae</i>
2124	<i>Corynebacterium</i> grupo G	77	Muito boa identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2125 A	<i>Corynebacterium</i> grupo G	77	Muito boa identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2130	<i>Corynebacterium</i> grupo G	56	Muito boa identificação no gênero	<i>C. striatum</i>
2219	<i>C. propinquum</i>	68	Fraca discriminação	<i>B. ravenpurgense/massiliense</i>
2228	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2230	<i>C. striatum/amycolatum</i>	64	Perfil duvidoso	<i>C. striatum</i>
2237	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2243	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2244	<i>C. striatum/amycolatum</i>	65	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2245	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2248	<i>Arthrobacter</i> spp.	47	Fraca discriminação	<i>A. albus/cuminsii</i>
2255	<i>C. jeikeium</i>	73	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2263	<i>C. striatum/amycolatum</i>	89	Identificação aceitável	<i>C. amycolatum</i>
2273	<i>C. striatum/amycolatum</i>	99	Boa identificação	<i>C. simulans</i>

**Tabela 7 (continuação)**

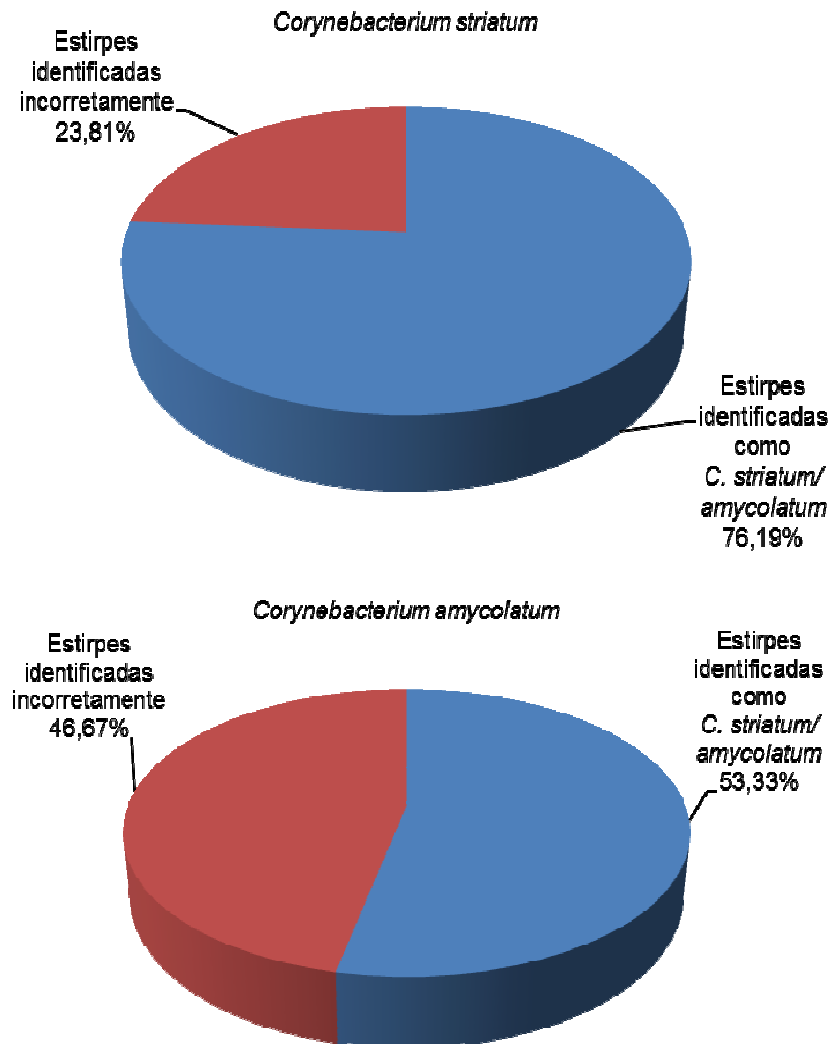
Comparação dos resultados obtidos pelo sistema semi-automatizado API Coryne com os obtidos pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

<b>Estirpe</b>	<b>API Coryne</b>	<b>%</b>	<b>Observação gerada pelo API Coryne</b>	<b>Identificação genotípica</b>
2282	<i>C. striatum/amycolatum</i>	82	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2285	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2287 A	<i>C. striatum/amycolatum</i>	82	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2287 B	<i>C. urealyticum</i>	96	Boa identificação	<i>C. urealyticum</i>
2296	<i>C. striatum/amycolatum</i>	89	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2298	<i>C. striatum/amycolatum</i>	55	Boa identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2305	<i>C. jeikeium</i>	73	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2308	<i>C. striatum/amycolatum</i>	89	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2314	<i>Microbacterium spp./L. aquatica</i>	48	Fraca discriminação	<i>B. casei</i>
2316	<i>C. striatum/amycolatum</i>	97	Boa identificação	<i>C. striatum</i>
2324	<i>C. afermentans/coyleae</i>	75	Identificação incorreta	<i>C. striatum</i>
2325	<i>C. jeikeium</i>	94	Boa identificação	<i>C. jeikeium</i>
2346	<i>C. propinquum</i>	70	Perfil duvidoso	<i>B. massiliense/ravenspurgense</i>
2354	<i>Corynebacterium grupo G</i>	77	Muito boa identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2369	<i>C. striatum/amycolatum</i>	82	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2376	<i>Corynebacterium macginley</i>	97	Boa identificação	<i>C. striatum</i>
2385	<i>Arthrobacter spp.</i>	38	Fraca discriminação	<i>B. sanguinis/celere</i>
2387	<i>Microbacterium spp./L. aquatica</i>	99	Boa identificação	<i>Microbacterium spp.</i>
2407	<i>C. striatum/amycolatum</i>	82	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2422	<i>C. striatum/amycolatum</i>	89	Identificação aceitável	<i>C. minutissimum</i>
2425	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2431	<i>C. urealyticum</i>	96	Boa identificação	<i>C. urealyticum</i>
2432	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2439	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2443A	<i>C. jeikeium</i>	73	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2443B	<i>C. jeikeium</i>	94	Boa identificação	<i>C. jeikeium</i>
2444	<i>C. jeikeium</i>	94	Boa identificação	<i>C. jeikeium</i>
2451	<i>C. propinquum</i>	56	Identificação incorreta	<i>B. massiliense/ravenspurgense</i>
2454	<i>C. striatum/amycolatum</i>	87	Identificação aceitável	<i>C. striatum</i>
2459	<i>C. striatum/amycolatum</i>	82	Excelente identificação no gênero	<i>C. amycolatum</i>
2477 (HC07)	<i>C. diphtheriae biotipo gravis</i>	98	Boa identificação	<i>C. diphtheriae</i>
2509	<i>C. auris/Turicella otitidis</i>	74	Fraca discriminação	<i>C. jeikeium</i>
7057	<i>E. rusiopatiae</i>	95	Boa identificação	<i>Abiotrophia defectiva</i>
7058	<i>E. rusiopatiae</i>	95	Boa identificação	<i>Abiotrophia defectiva</i>
7059	<i>E. rusiopatiae</i>	95	Boa identificação	<i>Abiotrophia defectiva</i>
7060	<i>E. rusiopatiae</i>	81	Identificação aceitável	<i>Abiotrophia defectiva</i>

**Figura 5.** Avaliação da identificação realizada pelo sistema API Coryne quanto ao gênero em comparação com a metodologia de referência.



**Figura 6.** Avaliação da identificação realizada pelo sistema API Coryne para as espécies *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium amycolatum* em comparação com a metodologia de referência.



### 5.1.3 Sistema VITEK 2

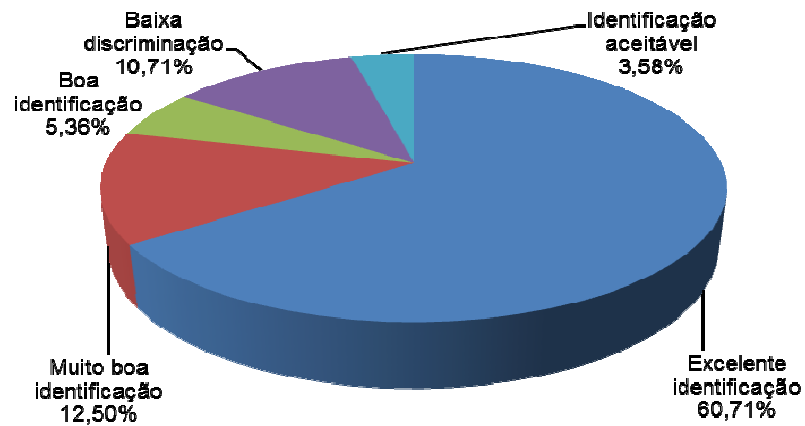
Todas as estirpes foram submetidas à identificação pelo VITEK 2, utilizando a cartão ANC. Segundo os critérios recomendados pelo Manual “Informação de Produtos ANC – Ref. 24321A” (BioMérieux), das 56 estirpes analisadas, 34 (60,71%) apresentaram excelente identificação, 7 (12,5%) muito boa identificação, 3 (5,36%) boa identificação, 6 (10,71%) baixa discriminação e 2 (3,58%) identificação aceitável. Quatro estirpes (2219, 2346, 2376 e 2422) não foram submetidas à identificação pelo VITEK 2 por não ter sido possível criar uma suspensão bacteriana homogênea, uma vez que as colônias não solubilizaram na salina (**Figura 7**).

Segundo o referido critério, valores iguais ou superiores a 96% de probabilidade são considerados para identificação correta ao nível de espécie. Assim, das 34 (60,71%) estirpes que apresentaram excelente identificação ( $\geq 96\%$ ) 25 (73,53%) foram identificadas corretamente quanto à espécie determinada pela análise do sequenciamento dos genes.

Os resultados obtidos pelo VITEK 2 foram comparados aos obtidos pelas análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*, conforme mostrado na **Tabela 8**. Assim, das 56 estirpes avaliadas pelo sistema VITEK 2, 46 (82,15%) foram identificadas corretamente quanto ao gênero, 6 (10,71%) foram identificadas incorretamente quanto ao gênero e 4 (7,14%) estirpes não puderam ser submetidas a esse sistema (**Figura 8**). Com relação à identificação do gênero *Corynebacterium*, as espécies de *C. urealyticum*, *C. diphtheriae* e *C. jeikeium* foram identificadas corretamente. Para a espécie de *C. striatum*, 11 (52,38%) estirpes foram identificadas corretamente, 9 (42,86%) estirpes foram identificadas equivocadamente e 1 (1,64%) não pode ser avaliada pelo sistema VITEK 2. Para a espécie *C. amycolatum*, 11 (73,33%) estirpes foram identificadas corretamente e 4 (26,67%) foram identificadas incorretamente (**Figura 9**).

As estirpes 7057 a 7060 foram identificadas equivocadamente pelo sistema VITEK 2 quando comparadas com a caracterização genotípica. As estirpes 7057 e 7059 foram identificadas como *Alloiococcus otitis/Granulicatella elegans*. A estirpe 7058 foi identificada como *Gemella sanguinis/G. elegans*. A estirpe 7060 foi identificada como *G. elegans*.

**Figura 7.** Identificação baseada nos critérios do sistema VITEK 2.



**Tabela 8**

Comparação dos resultados obtidos pelo sistema automatizado VITEK 2 com os obtidos pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

Estirpe	VITEK 2	%	Observação gerada pelo VITEK 2	Identificação genotípica
2080	<i>C. aerofaciens</i> <sup>1</sup> / <i>C. jeikeium</i> / <i>P. acnes</i> <sup>2</sup>	-	Baixa discriminação	<i>B. sanguinis/celere</i>
2089	<i>C. striatum</i>	94	Muito boa identificação	<i>C. striatum</i>
2091	<i>C. striatum</i>	94	Muito boa identificação	<i>C. striatum</i>
2092	<i>P. acnes</i>	91	Boa identificação	<i>B. casei</i>
2103	<i>C. striatum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2111 (HC06)	<i>C. diphtheriae</i>	99	Excelente identificação	<i>C. diphtheriae</i>
2124	<i>C. amycolatum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2125 A	<i>C. amycolatum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2130	<i>C. striatum/amycolatum/Minutissimum</i>	-	Baixa discriminação	<i>C. striatum</i>
2219	NR <sup>3</sup>			<i>B. ravenpurgense/massiliense</i>
2228	<i>C. minutissimum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2230	<i>C. minutissimum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2237	<i>C. minutissimum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2243	<i>C. striatum</i>	94	Muito boa identificação	<i>C. striatum</i>
2244	<i>C. jeikeium</i>	96	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2245	<i>C. minutissimum</i>	95	Muito boa identificação	<i>C. striatum</i>
2248	<i>C. pseudodiphtheriticum/P. acnes</i>	-	Baixa discriminação	<i>A. albus/cuminsii</i>
2255	<i>C. amycolatum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2260	<i>C. urealyticum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. urealyticum</i>
2263	<i>C. amycolatum/C. jeikeium</i>	-	Baixa discriminação	<i>C. amycolatum</i>
2273	<i>C. jeikeium</i>	96	Excelente identificação	<i>C. simulans</i>



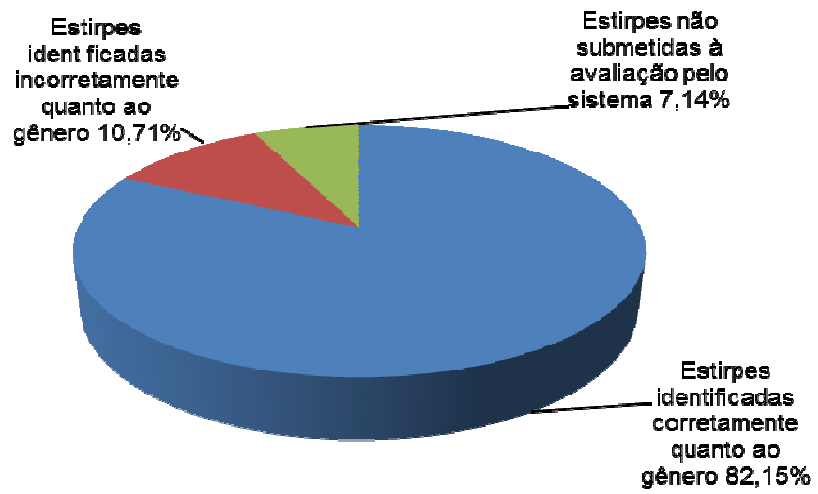
**Tabela 8 (continuação)**

Comparação dos resultados obtidos pelo sistema automatizado VITEK 2 com os obtidos pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

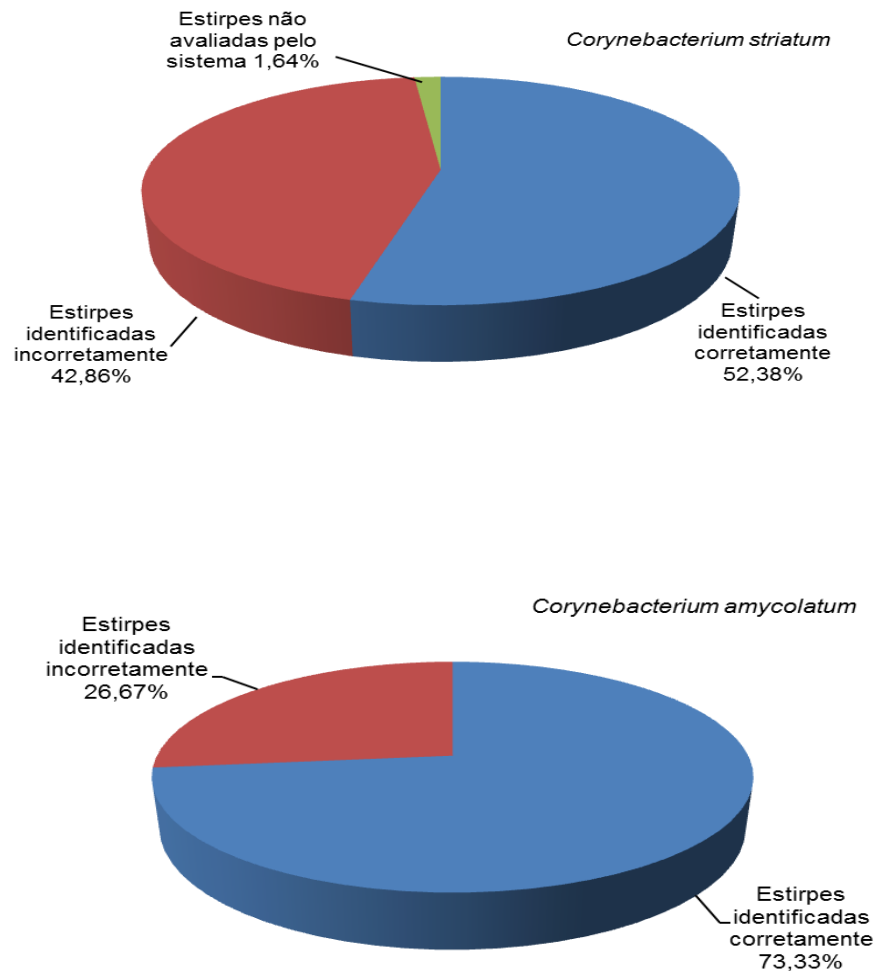
Estirpe	VITEK 2	%	Observação gerada pelo VITEK 2	Identificação genotípica
2282	<i>C. amycolatum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2285	<i>C. minutissimum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2287 A	<i>C. amycolatum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2287 B	<i>C. urealyticum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. urealyticum</i>
2296	<i>C. minutissimum</i>	90	Boa identificação	<i>C. striatum</i>
2298	<i>C. amycolatum/C. jeikeium</i>	-	Baixa discriminação	<i>C. amycolatum</i>
2305	<i>C. jeikeium</i>	96	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2308	<i>C. minutissimum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2314	<i>P. acnes</i>	88	Identificação aceitável	<i>B. casei</i>
2316	<i>C. striatum</i>	95	Muito boa identificação	<i>C. striatum</i>
2324	<i>C. minutissimum</i>	96	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2325	<i>C. jeikeium</i>	99	Excelente identificação	<i>C. jeikeium</i>
2346	NR			<i>B. massiliense/ravenspurgense</i>
2354	<i>C. amycolatum</i>	93	Muito boa identificação	<i>C. amycolatum</i>
2369	<i>C. amycolatum</i>	96	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2376	NR			<i>C. striatum</i>
2385	<i>C. aerofaciens/C. jeikeium/P. acnes</i>	-	Baixa discriminação	<i>B. sanguinis/celere</i>
2387	<i>C. minutissimum</i>	87	Identificação aceitável	<i>Microbacterium spp.</i>
2390	<i>C. striatum</i>	98	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2401	<i>C. striatum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2404	<i>C. amycolatum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2407	<i>C. amycolatum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2422	NR			<i>C. minutissimum</i>
2425	<i>C. striatum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2431	<i>C. urealyticum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. urealyticum</i>
2432	<i>C. striatum</i>	98	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2439	<i>C. striatum</i>	94	Muito boa identificação	<i>C. striatum</i>
2443 A	<i>C. amycolatum</i>	99	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2443 B	<i>C. jeikeium</i>	97	Excelente identificação	<i>C. jeikeium</i>
2444	<i>C. jeikeium</i>	99	Excelente identificação	<i>C. jeikeium</i>
2451	<i>P. acnes</i>	90	Boa identificação	<i>B. massiliense/ravenspurgense</i>
2454	<i>C. striatum</i>	98	Excelente identificação	<i>C. striatum</i>
2459	<i>C. amycolatum</i>	97	Excelente identificação	<i>C. amycolatum</i>
2477 (HC07)	<i>C. diphtheriae</i>	99	Excelente identificação	<i>C. diphtheriae</i>
7057	<i>A. otitidis/G. elegans</i>	-	Baixa discriminação	<i>A. defectiva</i>
7058	<i>G. sanguinis/G. elegans</i>	-	Baixa discriminação	<i>A. defectiva</i>
7059	<i>A. otitidis/G. elegans</i>	-	Baixa discriminação	<i>A. defectiva</i>
7060	<i>G. elegans</i>	95	Muito boa identificação	<i>A. defectiva</i>

<sup>1</sup> *Collinsela aerofaciens*; <sup>2</sup> *Propionibacterium acnes*; <sup>3</sup> NR: não realizado.

**Figura 8.** Avaliação da identificação realizada pelo sistema VITEK 2 quanto ao gênero em comparação com a metodologia de referência.



**Figura 9.** Avaliação da identificação realizada pelo sistema VITEK 2 para as espécies *Corynebacterium striatum* e *Corynebacterium amycolatum* em comparação com a metodologia de referência.



## 5.2. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Utilizando a técnica da PCR, os genes 16S rRNA e *rpoB* foram amplificados para as 60 estirpes. Foram obtidos amplicons do gene 16S rRNA de aproximadamente 1500 pb. As sequências do gene 16S rRNA determinadas variaram de 1295 pb a 1507 pb. Estas sequências foram editadas e submetidas ao BLAST – NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e ao SEQUENCE MATCH - Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) para determinação da similaridade destas com as sequências depositadas. Foi possível determinar os seguintes gêneros bacterianos, além de *Corynebacterium* (78,32%): *Abiotrophia* (6,67%), *Arthrobacter* (1,67%), *Brevibacterium* (11,67%) e *Microbacterium* (1,67%) **(Figura 10)**.

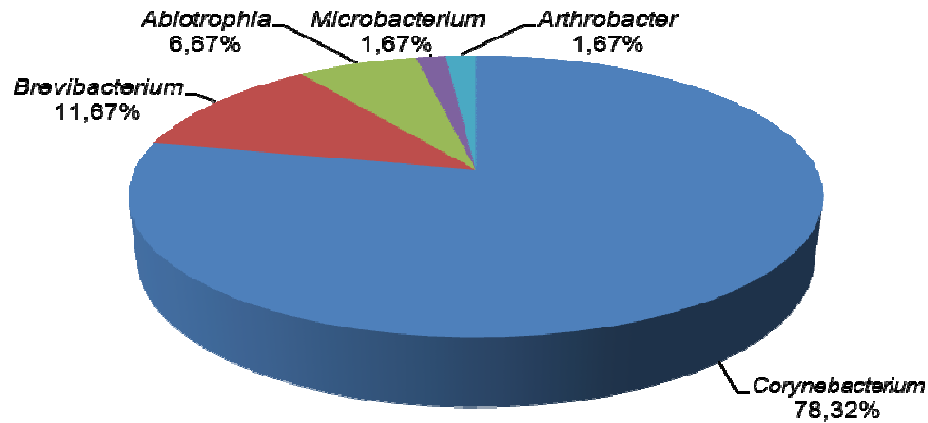
Foram obtidos amplicons do gene *rpoB* de aproximadamente 400 pb. As sequências determinadas variaram de 346 pb a 432 pb. Estas sequências foram editadas e submetidas ao BLAST – NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinação da similaridade destas com as sequências depositadas. As estirpes pertencentes a outros gêneros, que não *Corynebacterium* apresentaram valores abaixo de 90% com sequências depositadas no banco.

Os pontos de corte considerados na identificação das estirpes utilizando as análises dos genes 16S rRNA e *rpoB* foram de 98,70% e 95%, respectivamente. As similaridades das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* estão apresentados nas **Tabelas 9 a 12**.

As estirpes pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Microbacterium* e algumas do gênero *Brevibacterium* não tiveram a espécie determinada utilizando estas análises.

Utilizando a análise do gene 16S rRNA foi possível determinar a espécie de 97,87% das estirpes de *Corynebacterium*. Para a determinação da espécie da estirpe 2422 (*C. minutissimum*) foi necessária a análise da sequência do gene *rpoB*. A caracterização genotípica possibilitou a identificação da espécie de 47 estirpes de *Corynebacterium*, sendo elas: *C. striatum* (44,68%), *C. amycolatum* (31,91%), *C. jeikeium* (8,51%), *C. urealyticum* (6,39%), *C. diphtheriae* (4,26%), *C. simulans* (2,12%), e *C. minutissimum* (2,12%) **(Figura 11)**.

**Figura 10.** Gêneros bacterianos caracterizados neste estudo utilizando a análise das sequências do gene 16S rRNA.



**Tabela 9**

Identificação genotípica de *Corynebacterium striatum* pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

Estirpe	% similaridade 16S rRNA	pb	% similaridade <i>rpoB</i>	pb
2089	99,69 <i>Corynebacterium striatum</i>	1305	97,11 <i>Corynebacterium striatum</i>	418
2091	99,38 <i>Corynebacterium striatum</i>	1299	97,12 <i>Corynebacterium striatum</i>	417
2103	99,77 <i>Corynebacterium striatum</i>	1306	96,65 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2130	99,32 <i>Corynebacterium striatum</i>	1477	98,56 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2228	99,37 <i>Corynebacterium striatum</i>	1430	97,11 <i>Corynebacterium striatum</i>	418
2230	99,35 <i>Corynebacterium striatum</i>	1399	97,13 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2237	99,44 <i>Corynebacterium striatum</i>	1453	97,13 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2243	99,77 <i>Corynebacterium striatum</i>	1295	97,12 <i>Corynebacterium striatum</i>	417
2245	99,77 <i>Corynebacterium striatum</i>	1308	97,12 <i>Corynebacterium striatum</i>	417
2285	99,69 <i>Corynebacterium striatum</i>	1304	97,01 <i>Corynebacterium striatum</i>	415
2296	99,44 <i>Corynebacterium striatum</i>	1442	99,28 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2308	98,96 <i>Corynebacterium striatum</i>	1421	97,11 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2316	99,61 <i>Corynebacterium striatum</i>	1305	97,12 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2324	99,69 <i>Corynebacterium striatum</i>	1296	96,89 <i>Corynebacterium striatum</i>	414
2376	99,12 <i>Corynebacterium striatum</i>	1483	97,12 <i>Corynebacterium striatum</i>	416
2390	99,39 <i>Corynebacterium striatum</i>	1480	98,04 <i>Corynebacterium striatum</i>	412
2401	99,45 <i>Corynebacterium striatum</i>	1311	97,12 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2425	99,77 <i>Corynebacterium striatum</i>	1307	99,28 <i>Corynebacterium striatum</i>	420
2432	99,77 <i>Corynebacterium striatum</i>	1310	99,28 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2439	99,76 <i>Corynebacterium striatum</i>	1309	97,13 <i>Corynebacterium striatum</i>	419
2454	99,30 <i>Corynebacterium striatum</i>	1456	97,10 <i>Corynebacterium striatum</i>	415

**Tabela 10**

Identificação genotípica de *Corynebacterium amycolatum* pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

<b>Estirpe</b>	<b>% similaridade 16S rRNA</b>	<b>pb</b>	<b>% similaridade <i>rpoB</i></b>	<b>pb</b>
2124	99,07 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1414	99,50 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	406
2125 A	99,00 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1503	98,78 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	404
2244	99,14 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1490	98,77 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	406
2255	99,07 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1507	98,77 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	406
2263	99,07 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1425	99,25 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	406
2282	99,14 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1486	98,77 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	406
2287 A	99,14 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1489	98,77 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	407
2298	98,84 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1465	99,00 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	405
2305	99,07 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1421	98,51 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	405
2354	99,06 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1481	96,52 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	405
2369	99,08 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1488	98,75 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	400
2404	98,93 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1413	99,26 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	407
2407	99,14 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1485	98,76 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	406
2443 A	99,07 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1447	99,00 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	406
2459	99,14 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1484	98,74 <i>Corynebacterium amycolatum</i>	401

**Tabela 11**

Identificação genotípica pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB* de outras espécies de *Corynebacterium*.

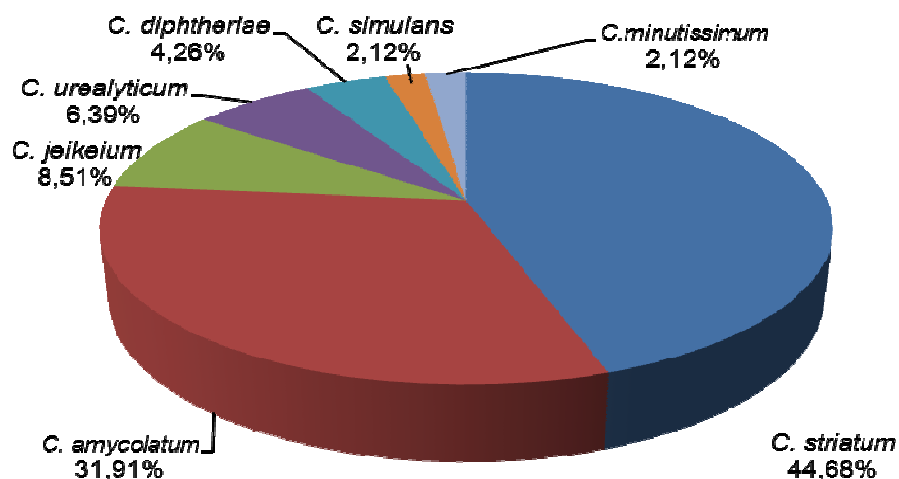
<b>Estirpe</b>	<b>% similaridade 16S rRNA</b>	<b>pb</b>	<b>% similaridade <i>rpoB</i></b>	<b>pb</b>
2111/HC06	99,39 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1470	98,53 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	410
2477/HC07	99,46 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1491	99,28 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	419
2325	99,72 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	1415	100,00 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	424
2443 B	99,79 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	1439	96,60 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	413
2444	99,78 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	1406	96,53 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	405
2509	99,80 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	1497	95,89 <i>Corynebacterium jeikeium</i>	440
2273	99,52 <i>Corynebacterium simulans</i>	1498	97,60 <i>Corynebacterium simulans</i>	418
2260	99,35 <i>Corynebacterium urealyticum</i>	1472	99,06 <i>Corynebacterium urealyticum</i>	432
2287 B	99,43 <i>Corynebacterium urealyticum</i>	1499	99,29 <i>Corynebacterium urealyticum</i>	425
2431	99,45 <i>Corynebacterium urealyticum</i>	1491	99,29 <i>Corynebacterium urealyticum</i>	425
2422	99,02 <i>Corynebacterium minutissimum</i>	1487	97,83 <i>Corynebacterium minutissimum</i>	419
	99,02 <i>Corynebacterium singulare</i>			

Tabela 12

Identificação genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA de outros gêneros bacterianos.

Estirpe	% similaridade 16S rRNA	pb
7057	99,07 <i>Abiotrophia defectiva</i>	1444
7058	99,12 <i>Abiotrophia defectiva</i>	1384
7059	99,09 <i>Abiotrophia defectiva</i>	1460
7060	98,96 <i>Abiotrophia defectiva</i>	1492
2248	99,18 <i>Arthrobacter cuminsii</i> 98,92 <i>Arthrobacter albus</i>	741
2092	99,57 <i>Brevibacterium casei</i>	1500
2314	99,72 <i>Brevibacterium casei</i>	1504
2219	99,79 <i>Brevibacterium ravensturgense</i> 99,65 <i>Brevibacterium massiliense</i>	1422
2346	99,79 <i>Brevibacterium massiliense</i> 99,52 <i>Brevibacterium ravensturgense</i>	1473
2451	99,86 <i>Brevibacterium massiliense</i> 99,58 <i>Brevibacterium ravensturgense</i>	1428
2080	99,59 <i>Brevibacterium sanguinis</i> 99,27 <i>Brevibacterium celere</i>	1501
2385	99,92 <i>Brevibacterium sanguinis</i> 99,77 <i>Brevibacterium celere</i>	1317
2387	99,53 <i>Microbacterium paraoxydans</i> 98,91 <i>Microbacterium oxydans</i> 98,78 <i>Microbacterium liquefaciens</i>	1491

Figura 11. Avaliação da caracterização genotípica das estirpes de *Corynebacterium* utilizando as análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*.



Uma comparação dos resultados obtidos pelos 4 métodos de identificação realizados neste estudo são apresentados na **Tabela 13**.

**Tabela 13**

Resultados obtidos pelos métodos de identificação fenotípica e genotípica realizados neste estudo.				
Estirpe	Identificação convencional	API Coryne	VITEK 2	Identificação genotípica
2080	NI <sup>1</sup>	<i>Rhodococcus</i> spp.	<i>C. aerofaciens</i> / <i>C. jeikeium</i> / <i>P. acnes</i>	<i>B. sanguinis</i> / <i>celere</i>
2089	NI	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2091	NI	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2092	NI	<i>Brevibacterium</i> spp.	<i>P. acnes</i>	<i>B. casei</i>
2103	NI	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2111 (HC06)	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i> biotipo <i>gravis</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>
2124	<i>C. minutissimum</i>	<i>Corynebacterium</i> grupo G	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2125 A	Complexo XSMA	<i>Corynebacterium</i> grupo G	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2130	<i>C. macginley</i>	<i>Corynebacterium</i> grupo G	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i> / <i>minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2219	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>C. propinquum</i>	NR <sup>2</sup>	<i>B. ravensturnense</i> / <i>massiliense</i>
2228	Complexo XSMA	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2230	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2237	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2243	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2244	<i>C. propinquum</i>	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>
2245	Complexo XSMA	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2248	<i>C. afermentans</i>	<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>C. pseudodiphtheriticum</i> <i>P. acnes</i>	<i>A. albus/cuminsii</i>
2255	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2260	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>
2263	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i> / <i>C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>
2273	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. simulans</i>
2282	Complexo XSMA	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2285	Complexo XSMA	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2287 A	Complexo XSMA	<i>C. striatum</i> / <i>amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>

Tabela 13 (continuação)

Resultados obtidos pelos métodos de identificação fenotípica e genotípica realizados neste estudo.

Estirpe	Identificação convencional	API Coryne	VITEK 2	Identificação genotípica
2287 B	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>
2296	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2298	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. amycolatum/ C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>
2305	Complexo XSMA	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>
2308	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2314	Corineforme	<i>Microbacterium</i> spp./ <i>L. aquatica</i>	<i>P. acnes</i>	<i>B. casei</i>
2316	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2324	<i>C. striatum</i>	<i>C. afermentans/ coyleae</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum</i>
2325	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>
2346	<i>C. afermentans</i>	<i>C. propinquum</i>	NR	<i>B. massiliense/ ravensturgense</i>
2354	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> grupo G	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2369	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2376	Complexo XSMA	<i>C. macginley</i>	NR	<i>C. striatum</i>
2385	Corineforme	<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>C. aerofaciens/ C. jeikeium/ P. acnes</i>	<i>B. sanguinis/ celere</i>
2387	<i>Leifsonia aquatica</i>	<i>Microbacterium</i> spp./ <i>L. aquatica</i>	<i>C. minutissimum</i>	<i>Microbacterium paraoxydans/ oxydans/ liquefaciens</i>
2390	Complexo XSMA	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2401	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2404	Complexo XSMA	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2407	Complexo XSMA	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2422	<i>C. minutissimum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	NR	<i>C. minutissimum</i>
2425	Complexo XSMA	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2431	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>	<i>C. urealyticum</i>
2432	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2439	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2443A	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>
2443B	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>
2444	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>
2451	NI	<i>C. propinquum</i>	<i>P. acnes</i>	<i>B. massiliense/ ravensturgense</i>
2454	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	<i>C. striatum</i>
2459	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. striatum/ amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>



**Tabela 13 (continuação)**

Resultados obtidos pelos métodos de identificação fenotípica e genotípica realizados neste estudo.

Estirpe	Identificação convencional	API Coryne	VITEK 2	Identificação genotípica
2477 (HC07)	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i> biotipo <i>gravis</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>
2509	NI	<i>C. auris</i> / <i>T. otitidis</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. jeikeium</i>
7057	NI	<i>E. rusiopatae</i>	<i>A. otitis</i> / <i>G. elegans</i>	<i>A. defectiva</i>
7058	NI	<i>E. rusiopatae</i>	<i>G. sanguinis</i> / <i>G. elegans</i>	<i>A. defectiva</i>
7059	NI	<i>E. rusiopatae</i>	<i>A. otitis</i> / <i>G. elegans</i>	<i>A. defectiva</i>
7060	NI	<i>E. rusiopatae</i>	<i>G. elegans</i>	<i>A. defectiva</i>

<sup>1</sup> NI: não identificado; <sup>2</sup> NR: não realizado

#### 5.4 SUSCETIBILIDADE AOS DIVERSOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os resultados da suscetibilidade aos antimicrobianos são apresentados nas **Tabelas 14 a 18**. Todas as estirpes de *C. striatum* (**Tabela 14**) testadas foram sensíveis à vancomicina e apresentaram sensibilidade variável aos demais antimicrobianos. O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das estirpes de *C. striatum* e *C. amycolatum* estão apresentados nas **Tabelas 8 e 9**.

**Tabela 14**Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de *Corynebacterium striatum*

Estirpes	ANTIBIÓTICOS <sup>1</sup>													PS <sup>2</sup>
	PEN	TET	AMP	RIF	GEN	LZD	CTX	IPM	CIP	ERI	CLI	VAN	SXT	
<b>2089</b>	NR <sup>3</sup>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-
<b>2091</b>	S <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	S	R	NR	S	NR	NR	S	R	R	S	R	-
<b>2103</b>	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
<b>2130</b>	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	NR	-
<b>2228</b>	R	S	R	S	S	NR	S	S	R	R	R	S	R	-
<b>2230</b>	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	V
<b>2237</b>	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	IV
<b>2243</b>	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
<b>2245</b>	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
<b>2285</b>	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
<b>2296</b>	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	VI
<b>2308</b>	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
<b>2316</b>	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
<b>2324</b>	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	II

**Tabela 14 (continuação)**Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de *Corynebacterium striatum*.

ANTIBIÓTICOS <sup>1</sup>														
Estirpes	PEN	TET	AMP	RIF	GEN	LZD	CTX	IPM	CIP	ERI	CLI	VAN	SXT	PS <sup>2</sup>
2376	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	VII
2390	R	S	R	R	R	S	NR	S	R	R	R	S	R	-
2401	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	III
2425	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	VIII
2432	S	NR	S	S	NR	S	S	S	R	R	R	S	R	-
2439	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
2454	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I

<sup>1</sup> AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CTX: cefotaxima; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; LZD: linezolida; PEN: penicilina G; RIF: rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina; <sup>2</sup> Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos; <sup>3</sup> NR: não realizado; <sup>4</sup> S: sensível; <sup>5</sup> R: resistente.

Todas as estirpes de *C. amycolatum* (Tabela 15) testadas foram sensíveis a vancomicina e linezolida e apresentaram sensibilidade variável para os demais antimicrobianos.

**Tabela 15**Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de *Corynebacterium amycolatum*.

ANTIBIÓTICOS <sup>1</sup>														
Estirpes	PEN	TET	AMP	RIF	GEN	LZD	CTX	IPM	CIP	ERI	CLI	VAN	SXT	PS <sup>2</sup>
2124	R <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	R	S	S	S	NR <sup>5</sup>	S	S	R	R	S	NR	-
2125 A	S	R	R	S	S	S	NR	S	R	R	R	S	NR	-
2244	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	IV
2255	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	IX
2263	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	V
2282	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	III
2287 A	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
2298	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	VII
2305	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR	S	S	S	-
2354	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	VI
2369	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	II
2404	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	VIII
2407	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
2443 A	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I
2459	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I

<sup>1</sup> AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CTX: cefotaxima; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; LZD: linezolida; PEN: penicilina G; RIF: Rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina; <sup>2</sup> OS: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos; <sup>3</sup> R: resistente; <sup>4</sup> S: sensível; <sup>5</sup> NR: não realizado.

As demais espécies de *Corynebacterium* (Tabela 16) apresentaram sensibilidade a tetraciclina, linezolida e vancomicina.

Tabela 16

Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes de *Corynebacterium*.

Estirpes	ANTIBIÓTICOS <sup>1</sup>												
	PEN	TET	AMP	RIF	GEN	LZD	CTX	IPM	CIP	ERI	CLI	VAN	SXT
<b><i>Corynebacterium diphtheriae</i></b>													
2111 (HC06)	S <sup>2</sup>	S	R <sup>3</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2477 (HC07)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NR <sup>4</sup>
<b><i>Corynebacterium jeikeium</i></b>													
2325	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
2443 B	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
2444	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
2509	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	NR
<b><i>Corynebacterium minutissimum</i></b>													
2422	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
<b><i>Corynebacterium urealyticum</i></b>													
2260	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
2287 B	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R
2431	R	S	R	R	S	S	R	R	NR	R	R	S	NR
<b><i>Corynebacterium simulans</i></b>													
2273	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R

<sup>1</sup> AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CTX: cefotaxima; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; LZD: linezolida; PEN: penicilina G; RIF: Rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina; <sup>2</sup> S: sensível; <sup>3</sup> R: resistente; <sup>4</sup> NR: não realizado.

Os demais gêneros (Tabela 17) apresentaram sensibilidade a vancomicina, imipenem e linezolida.

Tabela 17

Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes pertencentes a outros gêneros

Estirpes	ANTIBIÓTICOS <sup>1</sup>												
	PEN	TET	AMP	RIF	GEN	LZD	CTX	IPM	CIP	ERI	CLI	VAN	SXT
<b><i>Arthrobacter albus/comunsii</i></b>													
2248	R <sup>2</sup>	S <sup>3</sup>	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R
<b><i>Brevibacterium casei</i></b>													
2092	S	R	S	NR <sup>4</sup>	NR	S	NR	NR	S	R	S	S	R
2314	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
<b><i>Brevibacterium celere/sanguinis</i></b>													
2080	R	S	R	S	S	S	NR	S	R	S	R	S	NR
2385	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R

**Tabela 17 (continuação)**

Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das estirpes pertencentes a outros gêneros

Estirpes	ANTIBIÓTICOS <sup>1</sup>												
	PEN	TET	AMP	RIF	GEN	LZD	CTX	IPM	CIP	ERI	CLI	VAN	SXT
<b><i>Brevibacterium massiliense/ravenspurgense</i></b>													
2219	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
2346	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R
<b><i>Microbacterium paraoxydans/oxydans/liquefaciens</i></b>													
2387	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R

<sup>1</sup> AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CTX: cefotaxima; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; LZD: linezolid; PEN: penicilina G; RIF: Rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina; <sup>2</sup> R: resistente; <sup>3</sup> S: sensível; <sup>4</sup> NR: não realizado.

Para avaliar a suscetibilidade dos antimicrobianos testados, foram calculadas as porcentagens de sensibilidade das estirpes de *Corynebacterium* (Tabela 18).

**Tabela 18**Porcentagem de estirpes de *Corynebacterium* suscetíveis aos agentes antimicrobianos.

Espécies	ANTIBIÓTICOS <sup>1</sup>												
	PEN	TET	AMP	RIF	GEN	LZD	CTX	IPM	CIP	ERI	CLI	VAN	SXT
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	40	86	33	53	60	100	54	53	27	21	33	100	38
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	NA <sup>2</sup>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	NA
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	0	100	0	0	67	100	0	0	NA	0	0	100	NA
<i>Corynebacterium simulans</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	30	89	15	50	22	95	44	58	10	10	5	100	5

<sup>1</sup> AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CTX: cefotaxima; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; LZD: linezolid; PEN: penicilina G; RIF: Rifampicina; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina; <sup>2</sup> NA: não aplicado.

A distribuição das espécies mais prevalentes, *C. striatum* e *C. amycolatum*, nas Unidades Hospitalares do HUPE, assim como *C. jeikeium* e *C. urealyticum* está apresentada na **Tabela 19**.

**Tabela 19**

Distribuição das estirpes das espécies de *Corynebacterium* prevalentes nas unidades hospitalares do HUPE.

Unidade Hospitalar <sup>1</sup>	<i>C. striatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. urealyticum</i>
AMI	1			
Cardiologia		1		
Coronariana	1			1
CTI	1			
CTI Geral	2	2	3	
Dermatologia	1	1		
DIP	2		1	
Enf. NI, 12, 15, 17 e 18		7		1
Hematologia	2			
Nefrologia		1		
Ortopedia	1			
Pediatria	1			
Plantão Geral				1
Pneumologia	1			
Torácica	1			
UCIPG	3			
UI Clínica	2			
Urologia		1		
UTI Neonatal	1			

<sup>1</sup> Unidades do Hospital Pedro Ernesto, Rio de Janeiro: AMI: Ambulatório; CTI: Centro de Terapia Intensiva; DIP: Doenças Infectoparasitárias; Enf: Enfermaria; NI: não informado; UCIPG: Unidade Clínica Intermediária do Plantão Geral; UI Clínica: Unidade Intermediária clínica; UTI Neonatal: Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

## 6 DISCUSSÃO

O relato de infecções invasivas por corinebactérias tem aumentado nos últimos anos devido ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos e o melhor reconhecimento taxonômico das corinebactérias. Algumas corinebactérias fazem parte da microbiota normal de pele e de mucosas em humanos e estão distribuídas em diferentes nichos ecológicos como solo, esgoto, superfície de plantas, sendo algumas delas patogênicas para o homem e para os animais (CAMELLO et al, 2002, CHUNG, 2008, MARTINS et al, 2009, GOMES, 2013).

Até o momento, as INCS causadas por *Corynebacterium* tem sido relatadas com pouca frequência na literatura como relatos de casos, envolvendo os clones multirresistentes de *C. jeikeium* (IFANTIDOU et al, 2010, SATO; UCHIYAMA, 2012); *C. striatum* (CHEN et al, 2012) e *C. amycolatum* (YOON et al, 2011). Casos de bacteremias por cepas atoxinogênicas de *C. diphtheriae* (FARFOUR et al, 2012, WOJEWODA et al, 2012) também tem sido relatados, além de casos de bacteremias por espécies pouco isoladas, como *Corynebacterium falsenii* (TAM; FISHER; MILLER, 2010), *Corynebacterium ureicelerivorans* (FERNANDEZ-NATAL et al, 2009), *Corynebacterium aquatimens* (ARAVENA-ROMAN et al, 2012). Neste estudo foram caracterizadas 47 estirpes relacionadas a casos de infecções de corrente sanguínea causadas pelas espécies *C. striatum* (44,68%), *C. amycolatum* (31,91%), *C. jeikeium* (8,51%), *C. urealyticum* (6,39%), *C. diphtheriae* (4,26%), *C. simulans* (2,12%), e *C. minutissimum* (2,12%) (**Figura 11**). Estudos adicionais serão realizados para analisar o relacionamento clonal das estirpes de *C. striatum* com surto nosocomial ocorrido em 2010 (BAIO et al, 2013) no HUPE, utilizando o *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), uma vez que a maioria das estirpes de *C. striatum* caracterizadas no presente trabalho apresentaram o mesmo perfil de resistência das estirpes isoladas neste surto. O relacionamento clonal das estirpes de *C. amycolatum*, *C. jeikeium* e *C. urealyticum* também será avaliado em estudos posteriores.

A maioria das estirpes analisadas foi oriundas de pacientes diferentes e 27 (57,45%) estirpes foram isoladas de sangue. Apenas 5 pacientes apresentaram infecção da qual foi isolada mais de uma estirpe de *Corynebacterium*. Dois pacientes tiveram dois eventos de bacteremia causada por *C. striatum* num intervalo de tempo

de 7 e 18 dias (estirpes 2230 e 2237; 2425 e 2432). Em outros três pacientes foram observados eventos de bacteremia causada por diferentes espécies: *C. amycolatum* (2124) e *C. striatum* (2130); *C. amycolatum* (2282 e 2287A) e *C. urealyticum* (2287B); *C. amycolatum* (2443A) e *C. jeikeium* (2443B) (**Tabela 2**).

As corinebactérias são comumente consideradas como saprófitas ou contaminantes quando isoladas em cultura por serem encontradas no solo, poeira, materiais orgânicos ou na água. Por isso, mesmo a detecção no sangue tem sido considerada como pseudobacteremia (LEE et al, 2007, RIZVI et al, 2013). Um fator de confusão tem sido a possível contaminação durante a punção venosa causada pela microbiota colonizante da pele. Por essa razão, são desconsiderados como agentes etiológicos em processos infecciosos com graves consequências pelo retardamento do início do tratamento. O isolamento de *Corynebacterium* spp. provenientes de pacientes com neutropenia profunda e prolongada, além do cateter venoso central de longa permanência (principalmente em leucemias e linfomas), pode ser representativo de um processo infeccioso grave e que não deve ser negligenciado (VELASCO et al, 1992, THULER et al, 1998).

Estudos tem demonstrado que as espécies de *Corynebacterium* e vários corineformes, particularmente aqueles pertencentes à microbiota normal da pele, são contaminantes proeminentes de materiais clínicos, embora, ocasionalmente, seja difícil decidir corretamente em tempo hábil se a recuperação de tais bactérias implica em contaminação ou se tem relevância clínica (WEINSTEIN, 2008). Portanto, estes micro-organismos devem ser valorizados quando isolados (i) a partir de sítios normalmente estéreis, com exceção se recuperados apenas em uma das várias amostras colhidas; (ii) a partir de espécimes clínicos colhidos adequadamente, onde as espécies de *Corynebacterium* ou corineformes forem os micro-organismos predominantes, e (iii) se um único micro-organismo recuperado a partir de amostras de urina, por exemplo, *C. urealyticum*, tiver uma contagem  $\geq 10^4$  UFC/mL ou se a contagem do micro-organismo recuperado for  $\geq 10^5$  UFC/mL (FUNKE; BERNARD, 2011, BERNARD, 2012).

Endocardites causadas por espécies de *Corynebacterium* são raramente encontradas (BELMARES et al, 2007, GUERRERO et al, 2012). *C. diphtheriae* vem sendo isolado de infecções invasivas, como a endocardite infecciosa, que afeta pessoas vacinadas e não vacinadas e é principalmente induzida por isolados não produtores de toxina (VIGUETTI et al, 2011, PEIXOTO et al, 2013). Endocardite

infecçiosa por *C. diphtheriae* atoxinogênico tem sido relatada em diversos países (CLINTON et al, 2013, MUTTAIYAH et al, 2011, ZASADA, 2013). No Rio de Janeiro, cinco amostras atoxinogênicas já foram isoladas de casos de endocardite, no período de 1993 a 2003 (HC01, HC02, HC03, HC04 e HC05). Essas estirpes foram caracterizadas por MLST e não apresentaram relacionamento clonal. Recentemente, Zasada (2013) relatou um clone de *C. diphtheriae* atoxinogênico altamente patogênico na Polônia. Entre as estirpes caracterizadas neste trabalho, duas foram identificadas como *C. diphtheriae* biotipo *gravis* atoxinogênicas. A estirpe HC06, isolada em 2010, de um caso de endocardite em prótese aórtica em um paciente de 27 anos. A estirpe HC07 isolada em 2013, em um caso fatal de endocardite em válvula aórtica nativa de um paciente com 31 anos de idade. Ambos os casos ocorreram no Rio de Janeiro e o relacionamento clonal destas será determinado posteriormente (dados não publicados).

Dentre as corinebactérias, as espécies predominantemente isoladas neste estudo foram *C. striatum* (44,68%) e *C. amycolatum* (31,91%). A espécie *C. striatum* encontra-se amplamente distribuído no ambiente e é constituinte da microbiota normal da pele e de mucosas. No entanto, é potencialmente patogênico em circunstâncias específicas, incluindo infecções de pacientes com doenças crônicas, hospitalizações frequentes e prolongadas, exposição a antibióticos contra bactérias Gram-negativas (que facilita a seleção de bactérias Gram-positivas) e o uso de procedimentos invasivos (FUNKE; BERNARD, 2011, GOMILA et al, 2012). *C. striatum* passou a ser reconhecido como um patógeno emergente e tem sido relacionado a surtos epidêmicos, apresentando resistência intrínseca à maioria dos antibióticos recomendados ao tratamento de outros corineformes (OTSUKA et al, 2006, RENOM et al, 2007, KONEMAN, 2010, CAMPANILE et al, 2009, BAIIO et al, 2013, SAVINI et al, 2013). Sua transmissão hospitalar tem sido relatada com frequente aumento. Embora a importância e a prevalência de *C. striatum* como agente causador de doenças não estejam bem estabelecidas, este organismo tem sido responsável por uma variedade de infecções, tanto em indivíduos imunocomprometidos tanto em imunocompetentes, incluindo pneumonia, septicemia, endocardite, osteomielite, peritonite, artrite e meningite (MASHAVI et al, 2005, OTSUKA et al, 2006, GOMILA et al, 2012, BAIIO et al, 2013).

Nos últimos anos, a taxa de isolamento de *C. amycolatum* em espécimes clínicos tem aumentado e tem sido uma das espécies de corinebactérias mais



comumente isoladas de infecções de prótese articular (LAGROU et al, 1998, ESTEBAN et al, 1999, REDDY et al, 2012, CAZANAVE et al, 2012). Neste estudo, uma estirpe de *C. amycolatum* (2125A) foi isolada de um paciente com artrite séptica.

O uso de dispositivos invasivos e a exposição aos antibióticos podem facilitar a disseminação sistêmica de *C. striatum* e *C. amycolatum*. Estirpes de bastonetes Gram-positivos isoladas de espécimes clínicos não devem ser simplesmente descartadas como meros contaminantes, especialmente quando obtidas em cultura pura de pacientes imunocomprometidos fazendo uso de dispositivos invasivos (WONG et al, 2010). A presença de *C. striatum* e *C. amycolatum* em infecções de prótese articular e fraturas abertas e em osteomielite de vértebras tem sido anteriormente relatada (VON GRAEVENITZ et al, 1998, FUNKE; BERNARD, 2011, CAZANAVE et al, 2012).

Bactérias corineformes geralmente incluem bacilos Gram-positivos tanto aeróbicos quanto anaeróbicos, não-ácido-resistentes, pleomórficos, não-ramificados e ocasionalmente formas cocóides na coloração de Gram. Constituem um grupo bastante heterogêneo morfolologicamente e com poucas características bioquímicas em comum. Uma revisão compreendendo os gêneros que fazem parte do grupo dos micro-organismos corineformes evidenciou os gêneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Turicella*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Dermabacter*, *Exiguobacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Oerskovia* *Rothia*, dentre outros (FUNKE et al, 1997, JANDA, 1998b, CAMELLO, 2008, FUNKE; BERNARD, 2011).

Neste estudo, foram identificados em infecções de corrente sanguínea os seguintes gêneros bacterianos, além de *Corynebacterium* (78,32%): *Abiotrophia* (6,67%), *Arthrobacter* (1,67%), *Brevibacterium* (11,67%) e *Microbacterium* (1,67%) (**Figura 10**). Atualmente, há poucos relatos de bacteremia causada por estes gêneros bacterianos (BUSS; STARLIN; IWEN, 2014, ENOCH et al, 2011, SHIGETA et al, 2013, SHIN, HONG; SON, 2006, ULRICH et al, 2006). O gênero *Brevibacterium* foi o mais prevalente depois do gênero *Corynebacterium*, sete estirpes foram caracterizadas. As bactérias do gênero *Brevibacterium* são bastonetes Gram-positivos irregulares que apresentam características fenotípicas semelhantes as corinebactérias. Espécies deste gênero são considerados patógenos oportunistas e casos de bacteremia causados por *Brevibacterium* spp. tem sido quase exclusivamente descritos em pacientes imunocomprometidos.

Devido a dificuldade de identificação destes organismos, a prevalência deste gênero causando infecções humanas pode estar sendo subestimada (MANETOS et al, 2011, ULRICH et al, 2006).

As corinebactérias variam muito na morfologia e nas características fenotípicas das diferentes espécies. Algumas provas são utilizadas para diferenciar as principais corinebactérias isoladas em amostras clínicas, tais como redução de nitrato, urease, DNase, utilização de diferentes carboidratos e reação de CAMP. As corinebactérias são catalase positivas, imóveis, esculina e gelatina negativas, não se ramificam e não são álcool-ácido resistentes (JANDA, 1998a, ANVISA, 2004b, CAMELLO et al, 2008, FUNKE; BERNARD, 2011). Nossos achados mostraram que esses testes referidos como “chave” permitiram a identificação de todas as estirpes do gênero *Corynebacterium*, entretanto, as estirpes dos outros gêneros não foram identificadas. Os recentes avanços na identificação das corinebactérias mostraram que o gênero apresenta considerável complexidade taxonômica e que os marcadores fenotípicos usados no passado para a identificação das espécies desse gênero podem ser insuficientes e ambíguos (CAMELLO et al, 2002, OTSUKA et al, 2006, MEYER; REBOLI, 2009). Deste modo, observamos que apenas 46,81% (22/47) das estirpes deste gênero foram identificadas quanto à espécie, utilizando a caracterização fenotípica convencional.

As estirpes 2260, 2287B e 2431 identificadas como *C. urealyticum* apresentaram colônias branco-acinzentadas e puntiformes características da espécie. A hidrólise da uréia em meio DAU (Duplo Açúcar Ureia – glicose, maltose e uréia) e no API Coryne ocorreu rapidamente (cerca de 20 minutos de incubação a 37°C). Conforme Funke e Bernard (2011), estirpes desta espécie apresentam a característica de hidrólise forte e rápida da ureia, o que facilita a diferenciação das outras espécies de *Corynebacterium* que também hidrolisam a ureia.

Quanto às espécies mais prevalentes, *C. striatum* e *C. amycolatum*, a metodologia convencional identificou corretamente apenas 42,86% e 26,66% das estirpes, respectivamente (**Figura 3**). Quando o resultado proporcionado por essa metodologia foi “Complexo XSMA”, a identificação correta foi sempre *C. striatum* ou *C. amycolatum*. A redução do nitrato a nitrito, considerada como prova positiva (JANDA, 1998a, KONEMAN, 2010, FUNKE; BERNARD, 2011) para a espécie *C. striatum* foi observada em apenas 6/21 estirpes (**Tabela 4**). Esta característica encontrada na nossa amostragem pode ter gerado um equívoco na identificação

fenotípica, entretanto, este dado deve ser considerado na determinação desta espécie.

Os testes complementares (**Tabela 1**) recomendados para diferenciação das espécies pertencentes ao “Complexo XSMA” não auxiliaram na separação destas espécies. Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 5 e 6**. Este esquema baseado na identificação fenotípica pôde ser avaliado uma vez que utilizamos metodologias genotípicas como referência para a identificação das espécies do “Complexo XSMA”. Estes testes complementares auxiliaram na identificação de apenas duas estirpes de *C. striatum* e 1 estirpe de *C. amycolatum*.

As estirpes também foram caracterizadas pelo sistema comercial API Coryne. Este sistema identificou corretamente 85,70% das estirpes quanto ao gênero (**Figura 5**) e 14,28% quanto a espécie. Apenas as espécies de *C. urealyticum* e *C. diphtheriae* foram 100% identificadas corretamente. Segundo o banco de dados do API Coryne, é possível identificar as espécies *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium afermentans/coyleae*, *Corynebacterium argedoratense*, *Corynebacterium auris/Turicella otitidis*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium diphtheriae* (biotipos *gravis*, *mitis/belfanti*), *Corynebacterium glucoronolyticum*, *Corynebacterium* grupo F-1, *Corynebacterium* grupo G, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium kutscheri*, *Corynebacterium macginleyi*, *Corynebacterium propinquum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium urealyticum* e *Corynebacterium striatum/amycolatum*. É possível identificar também estirpes bacterianas pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Leifsonia*, *Propionibacterium*, *Rhodococcus*, entre outros (BIOMÉRIEUX, 2013). Deste modo, todos os gêneros e espécies de *Corynebacterium* avaliados neste estudo estavam incluídos no banco de dados deste sistema.

O API Coryne foi o único sistema fenotípico avaliado que identificou estirpes de gêneros diferentes de *Corynebacterium* como *Arthrobacter* (2248) e *Brevibacterium* (2092) (**Tabela 7**), entretanto, não separa as espécies *C. amycolatum* e *C. striatum*. Alguns testes complementares são recomendados para a separação das espécies *C. amycolatum*, *C. minutissimum* e *C. striatum*, tais como assimilação fenil-acetato e assimilação de N-acetil-glucosamina, porém estes testes não são acessíveis em muitos laboratórios. Por ser raramente isolada de espécimes

clínicos, a espécie *C. xerosis* foi excluída do banco de dados deste sistema (FUNKE; BERNARD, 2011).

O sistema automatizado VITEK 2 foi avaliado também na caracterização fenotípica das estirpes. O banco de dados para identificação do gênero *Corynebacterium* é mais limitado em comparação com o do sistema API Coryne, apenas oito espécies estão incluídas, *C. amycolatum*, *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. striatum*, *C. ulcerans* e *C. urealyticum*. É possível também identificar estirpes pertencentes aos gêneros *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Fusobacterium*, *Microbacterium*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, entre outros. Os gêneros *Arthrobacter* e *Brevibacterium*, presentes na nossa amostragem, não são incluídos neste banco de dados (BIOMÉRIEUX, 2009). Apesar destas limitações, este sistema identificou corretamente 82,15% das estirpes quanto ao gênero e 55,36% quanto a espécie.

Segundo o manual deste sistema (BIOMÉRIEUX, 2009), o intervalo de percentagem de probabilidades no caso de escolha única é de 85% a 99%. Os valores mais próximos de 99 indicam uma correspondência mais próxima do padrão típico para o micro-organismo em questão, assim, valores iguais ou superiores a 96% correspondem a excelente identificação e valores entre 93 a 95% a “muito boa identificação”. Neste estudo, 60,71% e 12,5% das estirpes apresentaram excelente e muito boa identificação, respectivamente, segundo o critério do sistema VITEK 2 (**Figura 7**). Todas as estirpes em questão foram identificadas corretamente quanto ao gênero. Por outro lado, é interessante ressaltar que 9 (26,46%) e 1 (14,23%) estirpes que apresentaram excelente e muito boa identificação pelo VITEK 2, respectivamente, não foram identificadas corretamente quanto à espécie, como determinado pelas metodologias genotípicas.

A caracterização genotípica utilizando as análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* permitiu a identificação de todas as estirpes isoladas de sítios intravenosos e também a avaliação das metodologias fenotípicas convencional e sistemas comerciais API Coryne e VITEK 2. Vários estudos tem utilizado a análise das sequências do gene 16S rRNA com a finalidade de identificar estirpes de importância clínica e diferentes valores de corte têm sido propostos para diferenciar espécies (BOSSHARD et al, 2003, CLARRIDGE, 2004, DRANCOURT, 2004, PETTI, 2007). Neste estudo, a espécie bacteriana foi determinada segundo os parâmetros

recomendados por Stackebrandt e Ebers (2006) que foi estabelecido de acordo com estudos taxonômicos. Esta análise permitiu a identificação de todas as estirpes quanto ao gênero entretanto não possibilitou a identificação da espécie de 7/60 (11,68%) estirpes que compartilham similaridade acima de 98,70% com mais de uma espécie tipo (**Tabelas 9 a 12**).

A análise das sequências do gene *rpoB* tem sido proposta como alternativa complementar a análise das sequências do gene 16S rRNA para identificação de espécies de *Corynebacterium* filogeneticamente relacionadas (*C. xerosis* e *C. amycolatum*, *C. freneyi* e *C. hansenii*, *C. ulcerans* e *C. pseudodiphthericum*) (KHAMIS et al, 2005, PALACIOS et al, 2010, FUNKE; BERNARD, 2011, BERNARD et al, 2013). Utilizando esta metodologia todas as identificações quanto a espécie do gênero *Corynebacterium* obtidas pela análise das sequências do gene 16S rRNA foram confirmadas. Apenas para uma estirpe (2422, *C. minutissimum*) foi necessária a análise da sequência do gene *rpoB* para definir a espécie.

A caracterização genotípica proporcionou a identificação de todas as estirpes do gênero *Corynebacterium*. As estirpes pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Microbacterium* e algumas do gênero *Brevibacterium* apresentaram a identificação da espécie indeterminada, pois as espécies indicadas pelas sequências do gene 16S rRNA compartilham similaridade acima do valor estabelecido para identificação. Entretanto, esta análise indicou as possíveis espécies destas estirpes. Além disso, a análise da sequência do gene *rpoB* não auxiliou a identificação das referidas estirpes quanto a espécie devido a ausência de depósitos das sequências deste gene das cepas tipo em questão disponíveis nos bancos de dados. A análise das sequências do gene 16S rRNA é amplamente utilizada na identificação bacteriana uma vez que há disponível um amplo banco de dados destas sequências. Isto por sua vez ocorre devido à obrigatoriedade de depositar as sequências do gene 16S rRNA para descrever espécies bacterianas. Sendo assim, quase a totalidade das sequências das cepas tipo estão disponíveis em bancos de dados.

Dentre as estirpes caracterizadas, apenas quatro não produziram a enzima catalase e foram identificadas como pertencentes a espécie *Abiotrophia defectiva*. Este gênero é encontrado na microbiota humana fazendo parte do trato genitourinário, oral e intestinal, entretanto podem atuar como patógeno oportunista. Bacteremia e endocardite infecciosa são as infecções mais frequentemente relatadas na literatura científica (RUOFF, 2011). As 4 estirpes de *Abiotrophia*

*defectiva* causaram endocardite subaguda em um paciente. Estes dados foram apresentados num relato do primeiro caso de endocardite infecciosa causado por este micro-organismo no Brasil (**APÊNDICES A e B**).

*A. defectiva* é frequentemente associada com hemoculturas negativas devido ao crescimento fastidioso. Por causa do seu isolamento pouco frequente, os microbiologistas não estão familiarizados com esta espécie bacteriana. Além disso, sua aparência cocobacilar pleomórfica e condições de crescimento exigentes tornam este micro-organismo difícil de identificar com metodologias bioquímicas (RUOFF, 2011). A espécie *A. defectiva* quando cultivada em condições subótimas, pode ser facilmente confundida com bastonetes Gram positivos e ser incluído em algoritmos de identificação equivocados (ROZEMEIJER et al, 2011). Devido às características morfológicas celulares apresentadas na coloração de Gram, neste estudo, as estirpes desta espécie foram equivocadamente identificadas pelo sistema API Coryne como *E. rhusiopathiae*. Estas estirpes foram também submetidas a caracterização pelo VITEK 2 (cartão GP) que indicou a presença *Streptococcus* nutricionalmente variantes (SNV), porém não identificou corretamente estas estirpes. Nossos resultados estão de acordo com Ratcliffe e colaboradores (2013), que demonstraram limitações do sistema VITEK 2 na identificação de SNV. A identificação correta destas estirpes foi obtida utilizando a análise das sequências do gene 16S rRNA.

Neste estudo, a identificação obtida pelas análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* foram utilizadas como metodologias de referência para avaliação da identificação das estirpes utilizando diferentes caracterizações fenotípicas. Os resultados destas avaliações estão apresentados na **Tabela 13** e **Figuras 2, 3, 5, 6, 8 e 9** onde podemos verificar as limitações de cada metodologia. Comparando as diferentes metodologias fenotípicas verificamos que apenas 8 (13,33%) estirpes apresentaram a mesma identificação. Se considerarmos correta a indicação do sistema API Coryne de *C. amycolatum/C. striatum*, cinco estirpes de *C. striatum* e duas de *C. amycolatum* também apresentaram identificação semelhante. Embora o sistema VITEK 2 tenha tido o melhor desempenho na identificação das espécies (55,36%), é interessante observar a não concordância dos diferentes sistemas de identificação fenotípica para a maioria das estirpes analisadas.

A caracterização genotípica foi importante para avaliação das metodologias fenotípicas que são amplamente utilizadas nos laboratórios clínicos. A abordagem

molecular tem sido ferramenta útil no diagnóstico de infecções causadas por micro-organismos fastidiosos ou aqueles que podem ser facilmente identificados erroneamente usando métodos de identificação fenotípica.

Diversos estudos tem mostrado um aumento na taxa de resistência aos antibióticos entre as espécies de *Corynebacterium*. Resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, clindamicina, eritromicina, ciprofloxacino e gentamicina tem sido relatada, levando algumas vezes ao uso de vancomicina como droga de escolha. Até o momento, vancomicina e teicoplanina são os agentes mais ativos *in vitro* contra corinebactérias (YOON et al, 2011, REDDY et al, 2012). Embora a maioria das corinebactérias seja suscetível à penicilina, infecções causadas por cepas resistentes de *C. jeikeium*, *C. striatum* e *C. amycolatum* tem sido relatadas (GUERRERO et al, 2012, LAPPA et al, 2012, FERNANDEZ GUERRERO et al, 2013). Mina e colaboradores (2011) relataram o primeiro caso de multirresistência em *C. diphtheriae*, onde a estirpe isolada apresentou resistência a eritromicina, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol e tetraciclina e elevada concentração mínima inibitória a cloranfenicol, ceftriaxona e cefotaxima. Na amostragem analisada, as estirpes de *C. diphtheriae* foram sensíveis a todos os antibióticos testados, exceto a estirpe HC06 que foi resistente apenas à ampicilina. A estirpe de *C. minutissimum* apresentou resistência apenas à clindamicina e *C. simulans* resistência à clindamicina e trimetoprim-sulfametoxazol (**Tabelas 16 e 18**).

Em infecções ligadas a espécies multirresistentes, o tratamento antimicrobiano não está satisfatoriamente estabelecido (BODEY, 1995, FUNKE et al, 1996, CAMELLO et al, 2002, FUNKE; BERNARD, 2011). *C. striatum* tem sido relacionado a surtos epidêmicos e tem apresentado resistência intrínseca à maioria dos antibióticos recomendados ao tratamento de outros corineformes (OTSUKA et al, 2006, RENOM et al, 2007, KONEMAN, 2010, CAMPANILE et al, 2009, BAIO et al, 2013, SAVINI et al, 2013). A maioria dos casos de endocardite por *C. striatum* resistentes à penicilina tem sido tratada com vancomicina em combinação com a substituição da válvula. Para as estirpes de *C. striatum* e *C. amycolatum* observamos 8 e 9 perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, respectivamente, sendo que o perfil I, que foi sensível apenas à tetraciclina, linezolida e vancomicina, foi comum à ambas espécies (**Tabelas 14 e 15**). Interessante observar que tal perfil foi predominante no surto ocorrido por *C. striatum* no HUPE em 2010 (BAIO et al,

2013). O perfil de suscetibilidade I também foi observado nas espécies *C. jeikeium* (3/4 estirpes) e *C. urealyticum* (1/3 estirpes) (**Tabela 16**).

*C. amycolatum* frequentemente mostra multirresistência aos antibióticos comumente utilizados, como os  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e fluoroquinolonas. Reddy e colaboradores (2012) mostraram que estirpes de *C. amycolatum* apresentaram variações nos padrões de resistência de acordo com o sítio de isolamento, o que não observamos entre as estirpes de *C. amycolatum* analisadas.

Os critérios de interpretação de sensibilidade aos agentes antimicrobianos para bactérias corineformes ainda não estão estabelecidos. A maioria das publicações utilizam os parâmetros recomendados por Funke e colaboradores (1996). Deste modo, tais parâmetros foram utilizados para interpretação dos resultados dos demais gêneros identificados. Para ilustrar a importância da determinação do perfil de suscetibilidade de bactérias corineformes, observamos estirpes multirresistentes dos gêneros *Arthrobacter* (2248), *B. massiliense/ravenspurgense* (2346 e 2451) e *Microbacterium* isoladas de sítios intravenosos (**Tabela 17**).



## 7 CONCLUSÕES

- As análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* identificou todas as espécies das 47 estirpes do gênero *Corynebacterium*: *C. striatum* (44,68%), *C. amycolatum* (31,91%), *C. jeikeium* (8,51%), *C. urealyticum* (6,39%), *C. diphtheriae* (4,26%), *C. simulans* (2,12%) e *C. minutissimum* (2,12%);
- A análise da sequência do gene *rpoB* confirmou a identificação de todas as espécies do gênero *Corynebacterium* obtidas pela análise das sequências do gene 16S rRNA. Apenas para a estirpe 2422 (*C. minutissimum*) foi necessária a análise da sequência do gene *rpoB* para definir a espécie;
- Utilizando apenas a análise da sequência do gene 16S rRNA foi possível determinar o gênero de todas as 60 estirpes isoladas de sítios intravenosos e distinguir os seguintes gêneros bacterianos, além de *Corynebacterium* (78,32%): *Brevibacterium* (11,67%), *Abiotrophia* (6,67%), *Arthrobacter* (1,67%) e *Microbacterium* (1,67%);
- A análise da sequência do gene 16S rRNA determinou a espécie de 86,67% (52/60) das estirpes analisadas;
- O gênero *Brevibacterium*, raramente descrito em casos de infecções humanas, foi o mais prevalente depois do gênero *Corynebacterium*;
- As estirpes de *A. defectiva* foram identificadas apenas pela análise da sequência do gene 16S rRNA. Devido às características intrínsecas da espécie, as identificações fenotípicas foram equivocadas;
- Apesar das estirpes pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Microbacterium* e algumas do gênero *Brevibacterium* apresentarem a identificação da espécie indeterminada, a análise das sequências do gene 16S rRNA indicou as prováveis espécies;
- A análise da sequência do gene *rpoB* não auxiliou a identificação da espécie para as estirpes que apresentaram espécie indeterminada devido a ausência de depósitos de sequências deste gene nos bancos de dados;
- A caracterização fenotípica permitiu a identificação do gênero para 76,79% utilizando a metodologia convencional e 85,70% e 82,15% pelos sistemas API Coryne e VITEK 2, respectivamente;

- Quanto à identificação correta da espécie, observamos os valores de 14,28%, 55,36% e 39,29% para os sistemas API Coryne, VITEK 2 e a metodologia convencional, respectivamente;
- Para o gênero *Corynebacterium*, 46,81%, 17,02% e 65,96% das estirpes foram identificadas corretamente quanto à espécie, pela metodologia convencional e sistemas API Coryne e VITEK 2, respectivamente;
- A espécie *C. striatum* foi identificada corretamente em 42,86% e 52,38% das estirpes pela metodologia convencional e sistema VITEK 2, respectivamente;
- A espécie *C. amycolatum* foi identificada corretamente em 26,66% e 73,33% das estirpes pela metodologia convencional e sistema VITEK 2, respectivamente;
- Utilizando o sistema API Coryne, foram identificadas como *C. striatum/amycolatum*, 76,19% e 53,33% das estirpes de *C. striatum* e *C. amycolatum*, respectivamente;
- Quando o resultado proporcionado pela metodologia convencional foi “Complexo XSMA”, a identificação correta foi sempre *C. striatum* ou *C. amycolatum*;
- O teste da redução do nitrato a nitrito não pode ser considerado como prova positiva para a espécie *C. striatum*, uma vez que foi observado em apenas 6/21 (28,57%) estirpes;
- Os testes complementares, fermentação da glicose a 20°C e 42°C, suscetibilidade ao O/129 e hidrólise da tirosina, não diferenciaram as espécies do “Complexo XSMA”;
- Apesar do banco de dados do VITEK 2 apresentar limitações em relação ao sistema API Coryne, o sistema apresentou melhores resultados na identificação de espécies;
- Das estirpes que apresentaram resultados “excelente” e “muito boa” identificação pelo sistema VITEK 2, 9 (26,46%) e 1 (14,23%) estirpes não foram identificadas corretamente quanto à espécie;
- A avaliação dos diferentes métodos fenotípicos mostrou que não houve concordância dos resultados de identificação para a maioria das estirpes analisadas. Apenas 8 estirpes apresentaram a mesma identificação para as 3 metodologias analisadas;

- As principais espécies do gênero *Corynebacterium* se encontravam amplamente distribuídas nas Unidades Hospitalares, exceto *C. jeikeium*, onde a maioria das amostras foi isolada de pacientes internados no Centro de Terapia Intensiva Geral;
- Em três casos de endocardite infecciosa, foram isoladas seis estirpes das espécies *C. diphtheriae* (dois casos) e *A. defectiva* (um caso);
- Uma estirpe de *C. amycolatum* (2125A) foi isolada de um paciente com artrite séptica;
- As estirpes de *C. diphtheriae*, *C. minutissimum* e *C. simulans* foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados;
- Oito e nove perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos foram encontrados para as estirpes de *C. striatum* e *C. amycolatum*, respectivamente. O perfil de suscetibilidade I foi predominante para essas espécies e observado também em *C. jeikeium* e *C. urealyticum*. Este perfil de multirresistência foi encontrado no surto ocorrido por *C. striatum* no mesmo hospital em 2010;
- Estirpes multirresistentes dos gêneros *Arthrobacter*, *B. massiliense/ravenspurgense* e *Microbacterium* foram também isoladas de sítios intravenosos;
- A caracterização genotípica foi importante para avaliação das metodologias fenotípicas que são amplamente utilizadas nos laboratórios clínicos.

## 8 REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. **Trends in Microbiology**, France, v. 17, n. 1, p. 37-45, 2009.

ALMUZARA, M. N. et al. Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos gram-positivos difteroides de importancia clínica. **Revista Argentina de Microbiología**, Argentina, v. 38, p. 197-201, 2006.

ANVISA. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar. In: **Caderno C Métodos de Proteção Anti-infecciosa**. Brasil, 2000. 84 p. Disponível em: <<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf>>. Acesso em 02 dez. 2013.

ANVISA. Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde. **Revista de Saúde Pública**, Brasil, v. 38, n. 3, jun. 2004a.

ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo V. Brasil, 2004b.

ANVISA. **Diagnóstico do controle da infecção hospitalar no Brasil**. Brasil, 30 mai. 2005, 19 p.

ANVISA. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. Brasil, mai. 2007, 21 p.

ANVISA. **Corrente sanguínea: Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde**. Brasil, set. 2009, 9 p.

ANVISA. **A Agência**. Brasília: [ANVISA], jan. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/agencia/destaques/apr+agencia>>. Acesso em 20 jan. 2012.

ANVISA. **Infecção de corrente sanguínea: Orientações para Prevenção de Infecção Primária de Corrente Sanguínea**. Brasil, set. 2010, 50 p.

ANVISA. **Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde**. Série: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Anvisa, 2013a. Disponível em: <

<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/segurancadopaciente/documentos/junho/Modulo%202%20-%20Crit%C3%A9rios%20Diagnosticos%20IRA%20Saude.pdf>. Acesso em 02 dez. 2013.

ANVISA. **Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasil, 04 out. 2013b. Disponível em: <[portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2013+noticias/comissao+nacional+de+prevencao+e+controle+de+infeccao+relacionada+a+assistencia+a+saude](http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2013+noticias/comissao+nacional+de+prevencao+e+controle+de+infeccao+relacionada+a+assistencia+a+saude)>. Acesso em 27 nov. 2013

ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Módulo 3 : **Principais Síndromes Infeciosas**. 2013c.

ANVISA. **Vigilância Sanitária no Brasil**. Brasília: [ANVISA], 2014a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Agencia/Assunto+de+Interesse/SNVS+-+Sistema+Nacional+de+Vigilancia+Sanitaria/Vigilancia-Sanitaria-no-Brasil>>. Acesso em 04 jan. 2014.

ANVISA. **Controle de Infecção em Serviços da Saúde**. Anvisa, 2014b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/legis.htm>>. Acesso em 04 jan. 2014.

ANVISA. **Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde – Rede RM**. 2014c.

ARAVENA-ROMAN, M. et al. *Corynebacterium aquatimens* sp. nov., a lipophilic *Corynebacterium* isolated from blood cultures of a patient with bacteremia. **Syst Appl Microbiol.**, v. 35, n. 6, p. 380-4, 2012.

ARAUJO, M. R. E. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **Journal of Infection Control**, v. 1, n. 1, 2012.

BAIO, P. V. P. **Identificação bioquímica e caracterização molecular de bactérias corineformes e nocardioformes de origem ambiental**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

BAIO, P. V. 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. **The Journal International Medical Research**, Turkey, v. 30, p. 422-427, 2002.

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

BERNARD, K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like. **Journal Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, 2012.

BERNARD, K. et al. Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2146-2154, 2013.

BIOMÉRIEUX. Brochura técnica: Informações biológicas para programas de identificação. França, ref. 41207, versão C, 2005.

BIOMÉRIEUX. Informação de Produtos dos Sistemas VITEK 2 System - documento nº 24321 A. Estados Unidos da América, jun. 2009.

BIOMÉRIEUX. **APIWEB**. Disponível em:  
<<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>>. Acesso em 13 dez. 2013.

BODEY, G. P. Emerging antimicrobial-resistant pathogens in the immunocompromised host. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 8, p. 411-414, 1995.

BOSSHARD, P. P. et al. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Zurich, v. 42, n. 5, p. 2065-2073, 2004.

BOSSHARD, P. P. et al. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE System and the VITEK 2 ID-GNB Card for identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbioly**, Zurich, v. 44, n. 4, p. 1359-1366, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 196, de 24 de junho de 1983. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jun. 1983.

BRASIL. Constituição (1988). Título VIII – Da ordem social. Capítulo II, Seção II – Da saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 out. 1988.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 930, de 27 de agosto de 1992. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 ago. 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, jan. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 2.616, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, mai. 1998.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 jan. 1999.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 44, de 26 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 out. 2010.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 20, de 05 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 mai. 2011.

BUSS, S. N.; STARLIN, R.; IWEN, P. C. Bacteremia caused by *Microbacterium binotii* in a patient with sickle cell anemia. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 379-381, 2014.

CAMELLO, T. C. F. et al. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 33, p. 1-4, 2002.

CAMELLO, T. C. F. ***Corynebacterium* spp. e outros micro-organismos corineformes de importância médica**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CAMPANILE, F. et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. **Emerg. Infect. Dis.**, Italy, v. 15, n. 1, p. 75-78, 2009.

CAZANAVE, C. et al. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. **Journal of Clinical Microbiology**, USA, v. 50, n. 5, p. 1518-1523, 2012.

CDC - Centers for Disease Control. **National Nosocomial Infection Study Report**. Atlanta: Centers for Disease Control, 1979.

CHEN, F. L. et al. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. **Journal of Microbiology and Immunology Infections**, v. 45, n. 3, p. 255-258, 2012.

CHUNG, C. S. et al. Percutaneous nephrostomy tube-associated bacteremia caused by *Corynebacterium urealyticum*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 41, p. 525-527, 2008.

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

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Principles and Procedures for Blood Cultures**; Approved Guideline. Document M47-A, United States of America, 2007a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or**



**fastidious bacteria.** Approved Standard Document M45-A, United States of America, 2007b, p. 4-6.

CLINTON, L. K. et al. Culture-negative prosthetic valve endocarditis with concomitant septicemia due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype *gravis* isolate in a patient with multiple risk factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3900-3902, 2013.

COYLE, M.; LIPSKY, B. A. Coryneform Bacteria in Infectious Diseases: clinical and laboratory aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v. 3, n. 3, p.227-246, 1990.

DALAL, A.; LIKHI, R. *Corynebacterium minutissimum* bacteremia and meningitis: a case report and review of literature. *The Journal of Infection*, vol. 56, nº 1, jan. 2008, pp. 77-9.

EIGNER, U. et al. Analysis of the Comparative Workflow and Performance Characteristics of the VITEK 2 and Phoenix Systems. **Journal of Clinical Microbiology**, Germany, v. 43, n. 8, p. 3829-3834, 2005.

ENOCH, D. A. et al. Central venous catheter-related bacteremia due to *Microbacterium paraoxydans* in a patient with no significant immunodeficiency. **Journal Clinical Pathol.**, v. 64, n. 2, p. 179-180, 2011.

ERBAY A. et al. Recurrent catheter-related bloodstream infections: risk factors and outcome. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 396-400, 2006.

ESTEBAN, J. et al. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Spain, v. 18, n. 7, p. 518-521, 1999.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN). 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 12 dez. 2013.

FARFOUR, E. et al. Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 173-175, 2012.

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

FERNANDEZ-NATAL, M. I. et al. Isolation of *Corynebacterium ureiceleivorans* from normally sterile sites in humans. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 677-681, 2009.

FUNKE, G. et al. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1124-1128, 1996.

FUNKE, G.; et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clinical Microbiology**, Zurich, v. 10, p. 125-159, 1997.

FUNKE, G.; BERNARD, K. A. Coryneform Gram-Positive Rods. In: VERSALOVIC, J.; et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10<sup>th</sup>. Washington, United States of America: Ed. ASM Press, 2011, p. 413-471, 1 v.

GOMES, M. J. P. Gênero *Corynebacterium*. In: Gêneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus* e *Trueperella*. **Faculdade de Medicina Veterinária/UFGRS**, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Coryne-Rhodo-Trueperella%204-2013-1.pdf>>. Acesso em 07 nov. 2013.

GOMILA, M. et al. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. **BMC Microbiology**, Spain, v. 12, n. 52, 2012.

GIUNTA, A. P. N.; LACERDA, R. A. Inspeção dos Programas de Controle de Infecção Hospitalar dos Serviços de Saúde pela Vigilância Sanitária: diagnóstico de situação. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, Brasil, v. 40, n. 1, p. 64-70, 2006.

GUERRERO, M. L. F. et al. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* endocarditis successfully treated with daptomycin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 373-379, 2012.

GUILARDE, A. O. et al. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. **Revista Associação Médica Brasileira**, Brasil, v. 53, n. 1, p. 34-38, 2007.

IFANTIDOU, A. M. et al. *Corynebacterium jeikeium* bacteremia in a hemodialyzed patient. **International Journal of Infectious Diseases**, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171132>>. Acesso em

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). **O instituto - apresentação**. Brasil, 2008. Disponível em: <[http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=61&Itemid=57](http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57)>. Acesso em 13 nov. 2011.

INTERNATIONAL SEPSIS FORUM. Promovendo um melhor entendimento da sepsis. Inglaterra e País de Gales, 2002, 12 p.

JANDA, W. M. *Corynebacterium* Species and the Coryneform Bacteria: Part I: New and Emerging Species in the Genus *Corynebacterium*. **Clinical Microbiology Newsletter**, United States of America, v. 20, n. 6, p. 41-52, 1998a.

JANDA, W. M. *Corynebacterium* Species and the Coryneform Bacteria: Part II: Current Status of the CDC Coryneform Groups. **Clinical Microbiology Newsletter**, United States of America, v. 20, n. 7, p. 53-66, 1998b..

JOHNSON, J. L. Similarity analysis of rRNAs. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. Página 691.

KHAMIS, A. R.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**. France, v. 42, n. 9, p. 3925-3931, 2004.

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

KNOX, K. L.; HOLMES, A. H. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other Nondiphtheriae Corynebacteria. **Emerging Infectious Diseases**, London, vol. 8, n. 1, p. 97-99, 2002.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2010, p. 777-827.

LAGROU, K. et al. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, Belgium, v. 30, n. 1, p. 7-15, 1998

LAPPA, A., et al. Treatment with daptomycin for *Corynebacterium jeikeium* left-sided prosthetic valve endocarditis. **Minerva Anestesiologica**, v. 78, n. 6, p. 729-732, jun. 2012.

LEE, C.C. et al. Clinical significance of potential contaminants in blood cultures among patients in a medical center. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, n. 5, p. 438-444, 2007.

LETEK, M.; et al. Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential *divIVA* genes as a target. **FEMS Microbiol. Lett.**, Spain, v. 265, n. 2, p. 256-263, 2006.

LÓPEZ-PUEYO, M. J. et al. Multirresistencia antibiótica em unidades de críticos. **Medicina Intensiva**. Espana, v. 35, n. 1, p. 41-53, 2011.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MANETOS, C. M. et al. Native aortic valve endocarditis caused by *Brevibacterium epidermidis* in an immunocompetent patient. **American Journal Medical Science**, v. 342, n. 3, p. 257-258, 2011

MARTINEZ-MARTINEZ, L. et al. Comparative in vitro activities of new quinolones against coryneform bacteria. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, Spain, v. 38, n. 6, p. 1439-1441, jun. 1994.

MARTINS, C. A. S. et al. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 104, n. 6, p. 905-913, 2009.

MASHAVI, M.; et al. First report of prosthetic mitral valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: successful medical treatment. Case report and literature review. **Journal of Infection**, ISRAEL, v. 52, p. 139-141, 2006.

MEYER, D. K.; RIBOLI, A. C. Others Coryneform bacteria and *Rhodococcus*. In: Mandell G.L., Dolin R., Bennett J.E. Eds. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 7th Ed, New York: Churchill-Livingstone, 2009.

MESIANO, E. R. A. B.; MERCHÁN-HAMANN, E. Infecções da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central em Unidades de Terapia Intensiva. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. Brasil, v. 15, n. 3, 2007.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA Sequencing in Routine Bacterial Identification: a 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, France, v. 67, n. 3, p. 574-581, 2006.

MINA, N. V. Canada's first case of a multidrug-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain, isolated from a skin abscess. **Journal Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 4003-4005, 2011.

MISTRY, N. F. et al. Rhodococcus and Mycobacterium tuberculosis: masquerade or mixed infection. **The International Journal of Tuberculosis Lung Disease**, United States of America, v. 10, n. 3, p. 351-353, 2006.

MUTTAIYAH, S. et al. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: a case series and review of the treatment approach. **Int J Infect Dis**. v. 15, 2011.

OLENDER, A. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Corynebacterium* spp. Causing Infections in People, Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium, Dr. Marina Pana (Ed.), ISBN: 978-953-51-0472-8, InTech, DOI: 10.5772/29418. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/antibiotic-resistant-bacteria-a-continuous-challenge-in-the-new-millennium/mechanisms-of-antibiotic-resistance-in-corynebacterium-spp-causing-infections-in-people>>. Acesso em 12 dez. 2013.

OLIVEIRA, A. C. et al. Healthcare-associated infection: challenges in its prevention and control. **Revista Mineira de Enfermagem**, Brazil, v. 13, n. 3, p. 445-450, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). **Centro de Prensa**, n. 194, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>>. Acesso em 27 mai. 2012.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS); ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS)/BRASIL. Rede de Monitoramento e Controle da Resistência

Microbiana em Serviços da Saúde. OPAS & OMS, 2009. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=169](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=169)>. Acesso em 27 mai. 2012.

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 Diseases**, v. 54, p. 109-114, 2006.

PALÁCIOS, L. et al. Characterization of Some Bacterial Strains Isolated from Animal Clinical Materials and Identified as *Corynebacterium xerosis* by Molecular Biological Techniques. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3138-3145, 2010.

PARTE, A. C. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN). 2014. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 12 dez. 2013.

PEIXOTO, R. S. et al. Invasion of endotelial cells and arthritogenic potential of endocarditis associated – *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24344208>>. Acesso em 04 jan. 2014.

PEREIRA, M. S. Infecção hospitalar e seu controle: problemática e o papel do enfermeiro. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, Brasil, v. 27, n. 3, p. 355-361, 1993.

PETIT, P. L. C. et al. A patient with CDC coryneform group ANF-3 endocarditis on a native aortic valve and review of endocarditis by corynebacteria. **Clinical Infectious Diseases**, The Netherlands, v. 19, n. 5, p. 897–900, 1994.

PETTI, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clinical Infectious Diseases**. v. 15, n. 44, p. 1108-1114, 2007.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiological Research**. v. 166, n.2, p. 99-110, 2010.

RATCLIFFE, P. Comparison if MALDI-TOF MS and VITEK2 system for laboratory diagnosis of *Granulicatella* and *Abiotrophia* species causing invasive infections. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 77, p. 216-9, 2013.

REDDY, B. S. et al. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). **Indian J. Med. Microbiol.**, INDIA, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2012.

RENNIE R. P. et al. Multicenter evaluation of the Vitek 2 Anaerobe and *Corynebacterium* Identification Card. **Journal of Clinical Microbiology**, Canadian, v. 46, n. 8, p. 2646-2651, 2008.

RENOM, F. et. al. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Spain, v. 45, n. 6, p. 2064-2067, 2007.

RICHERT, K.; BRAMBILLA, A.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16S rRNA genes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 102–108, 2007.

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

RIVAS, R. et al. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukariotes. **Journal Microbiology Methods**, Spain, v. 56, n. 3, p. 413-426, 2004.  
ROSSELLÓ-MORA, R. Updating prokaryotic taxonomy. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n. 18, p. 6255-6257, 2005.

ROZEMEIJER, W. et al. *Abiotrophia defectiva* infection of a total hip arthroplasty diagnosed by 16S rRNA gene sequencing. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 70, p. 142-4, 2011.

RUOFF, K. L. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and Other Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington, DC. 2011. pp 365-378.

SATO, K.; UCHIYAMA, M. *Corynebacterium jeikeium* bacteraemia and pulmonar infiltrates in a patient with acute myelogenous leukaemia. **BMJ Case Report**, v. 20, 2012.

SANTOS, A. A. M. et al. Diagnóstico do Controle da Infecção Hospitalar no Brasil. In: **Programa de Pesquisas hospitalares em busca de excelência**. ANVISA, 30 de maio de 2005. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/Infectes%20Hospitalares\\_diagnostico.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/Infectes%20Hospitalares_diagnostico.pdf)>. Acesso em 03 dez. 2013.

SAVINI, V. et al. About a bloodstream *Corynebacterium striatum* isolate. **Folia Microbiol.**, REPÚBLICA TCHECA, Epub ahead of print, 2013.

SATOMI, M.; LA DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p.1735-1740, 2006.

SCHRODER, J. et al. Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. **BMC Genomics**, Germany, v. 13, n. 141, 2012.

SCHLEIFER, K. H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, n. 8, p. 533-542, 2009.  
SEIFERT, H. The Clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 48, 2009.

SEWELL, D. L.; COYLE, M. B.; FUNKE, G. Prosthetic Valve Endocarditis Caused by *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum* (CDC Coryneform Group ANF-1). **Journal of Clinical Microbiology**, USA, v. 33, n. 3, p. 759-761, 1995.

SHIGETA, N. et al. An *Arthrobacter* spp. bacteremia leading to fetal death and maternal disseminated intravascular coagulation. **Fetal Pediatric Pathol.**, v. 31, n. 1, p. 25-31, 2013.

SHIN, K. S.; HONG, S. B.; SON, B. R. A case of catheter-related bacteremia by *Arthrobacter woluwensis*. **Korean J. Lab. Med.**, v. 26, n. 2, p. 103-106, 2006.

SIERRA, J. M.; et al. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, Spain, v. 49, n. 5, p. 1714-1719, 2005.



SILVA, A. J. R. et al. Infecção associada ao Cateter Venoso Central – Revisão da Literatura. **Revista Referência**, Brasil, II Série, n. 11, p. 125-134, 2009.

STACKEBRANDT, E. & EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**. v. 33, n. 4, p. 152-155, 2006.

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, United States of America, v. 24, n. 1, p. 141–173, 2011.

SUTTON, S. V. W.; CUNDELL, A. M. Microbial identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharm Forum**, United States of America, v. 30, n. 5, p. 1884-1894, 2004.

TEIXEIRA, P. J. Z.; et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. Brasil, v. 30, n. 6, p. 540-548, 2004.

TAM, P. Y.; FISHER, M. A.; MILLER, N. S. *Corynebacterium falsenii* bacteremia occurring in an infant on vancomycin therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3440-3442, 2010.

THULER, L. C.; et al. An outbreak of *Bacillus* species in a cancer hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 19, n. 11, p. 856-858, 1998.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 276-298. 2006.

ULRICH, S. et al. Central venous catheter infection with *Brevibacterium* sp. in an immunocompetent woman: case report and review of the literature. **Infection**, v. 34, n. 2, p. 103-106, 2006.

VANEECHOUTTE, M.; et al. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium* species. **Research in Microbiology**, Belgium, v. 146, n. 8, p. 633-641, 1995.

VELASCO, E. et al. *Bacillus subtilis* infection in a patient submitted to a bone marrow transplantation. **Revista Paulista de Medicina**, v. 110, n. 3, p. 116-117, 1992.

VENEZIA, J., et al. Characterization of *Corynebacterium* species in macaques.

**Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 1401-1408, 2012.

VIGUETTI, S. Z.; et al. Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. **Epidemiol Infect.**, v. 14, p. 1-4, 2011.

VON GRAEVENITZ, A.; et al. Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures. **Infection**, Switzerland, v. 26, n. 1, p. 36-38, 1998.

WATTS, J. L. et al. Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, USA, v. 83, n. 10, p. 2372-2379, 2000.

WEINSTEIN, M. P. Contaminated or not? Guidelines for interpretation of positive blood cultures. **WebM&M**. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. 2008. Disponível em: <[http://webmm.ahrq.gov/printviewcase.aspx?caseID\\_168](http://webmm.ahrq.gov/printviewcase.aspx?caseID_168)>.

WAUTERS, G. et al. Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1430-1432, 1998.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**. v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

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

WOJEWODA, C. M. et al. Bloodstream infection caused by nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in an immunocompromised host in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2170-2172, 2012.

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

YOON, S. et al. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. **Korean J. Lab. Med.**, Korea, v. 31, n. 1, p. 47-48, 2011.

ZASADA, A. A. Highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae*, Poland, 2004-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, 2013.

## APÊNDICE A – Comprovante de submissão do artigo

### Infection

#### A case report and literature overview: Abiotrophia defectiva aortic valve endocarditis in developing countries --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	A case report and literature overview: Abiotrophia defectiva aortic valve endocarditis in developing countries
Article Type:	Case Report
Keywords:	Abiotrophia defectiva; 16S rRNA gene sequencing; Infective Endocarditis (IE); Nutritionally Variant Streptococci (NVS)
Corresponding Author:	Verônica Viana Vieira, Ph.D. Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundação Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
Corresponding Author E-Mail:	veronicavianavieira@hotmail.com
First Author:	Juliana Nunes Ramos, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Juliana Nunes Ramos, M.D. Louisy Sanches Santos, M.D. Livia Maria Rubem Vidal, M.D. Paula Marcele Afonso Pereira, M.D. Angelo Antunes Salgado, M.D. Cláudio Querido Fortes, Ph.D. Verônica Viana Vieira, Ph.D. Ana Luíza Mattos-Guaraldi, Ph.D. Raphael Jr. Hirata, Ph.D. Paulo Vieira Damasco, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	A fatal case of aortic valve endocarditis due to Abiotrophia defectiva was reported in Brazil. An overview of cases of endocarditis and other human infections related to A. defectiva in developing countries was also accomplished.
Author Comments:	

## APÊNDICE B – Artigo submetido

### **A case report and literature overview: *Abiotrophia defectiva* aortic valve endocarditis in developing countries**

*Juliana Nunes Ramos*<sup>1,2\*</sup>, *Louisy Sanches dos Santos*<sup>1\*</sup>, *Livia Maria Rubem Vidal*<sup>3</sup>, *Paula Marcele Afonso Pereira*<sup>1</sup>, *Angelo Antunes Salgado*<sup>1</sup>, *Cláudio Querido Fortes*<sup>5</sup>, *Verônica Viana Vieira*<sup>3</sup>, *Ana Luíza Mattos-Guaraldi*<sup>1#</sup>, *Raphael Hirata Júnior*<sup>1</sup>, *Paulo Vieira Damasco*<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – FCM/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, INCQs/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>3</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>4</sup> Departamento de Doenças Infecciosas, Universidade do Rio de Janeiro - UNIRIO, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>5</sup> Hospital Clementino Fraga Filho; Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

\*JN Ramos and LS Santos contributed equally as first authors of this manuscript.

*Running title:* Infective endocarditis due to *Abiotrophia defectiva*

*Keywords:* *Abiotrophia defectiva*, ***Fishbone pricking***, Infective Endocarditis (IE), Nutritionally Variant Streptococci (NVS).

---

**#Correspondence to: Ana Luíza 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. Phone: +55 21 2868-8280; Fax: +55 21 2868-8376; E-mail: [guaraldi@uerj.br](mailto:guaraldi@uerj.br).

## Abstract

A fatal case of aortic valve endocarditis due to *Abiotrophia defectiva* was reported in Brazil. An overview of cases of endocarditis and other human infections related to *A. defectiva* in developing countries was also accomplished.

## Introduction

*Abiotrophia* sp., previously referred to as nutritionally variant streptococci (NVS), are found as part of the normal human microbiota colonizing oral, genitourinary, and intestinal tracts. In 1961, the NVS were first observed by Frenkel and Hirsch. They noted the growth of satellite colonies next to streaks of staphylococci, which provided pyridoxal and other nutrients that the NVS not produced [1]. These organisms have been reclassified in two genera, based on studies of the 16S rRNA gene sequences. *Abiotrophia defectiva* is the only species belonging to the genus *Abiotrophia* and *Abiotrophia adjacens*, *Abiotrophia balaenoptera* and *Abiotrophia elegans* belong to the genus *Granulicatella* [2]. *A. defectiva* presents itself mainly as Gram-positive cocci, but ovoid cells, although cocobacilli and bacilli may occur, depending on the culture medium. Cells are nonsporulating, nonmotile and facultative anaerobic [1].

Bacteremia and infective endocarditis (IE) are the most frequently reported clinical infections due to this pathogen worldwide [3]. Cases of *A. defectiva endocarditis* in patients with **native** (NVE) or **prosthetic heart valves (PVE) may occur** [4, 5]. This species has been also implicated in intravascular catheter-related bloodstream infection [6].

Infective endocarditis (IE) has an estimated annual incidence of 3 to 9 cases per 100,000 persons in industrialized countries [7]. Although the access to microbiology laboratory, echocardiography and epidemiological data of infective endocarditis in developing countries are scarce, there were *A. defectiva* reported cases in Asia and South American countries literature during the past 13 years [5, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

Accurate identification of *A. defectiva* is becoming increasingly important for studies of antimicrobial susceptibility, clinical and epidemiological investigations. In Brazil, the paucity of clinical reports suggests that *A. defectiva* may be underestimated as a cause of human infections and/or either neglected or

misidentified in laboratory specimens. Accordingly, the report of this case of fatal aortic valve endocarditis due to *A. defectiva* and the accompanying overview of cases of endocarditis related to *A. defectiva* in developing countries may be of interest for clinical practice.

**Case report.** A fatal case of aortic valve endocarditis due to *Abiotrophia defectiva* was first reported in Brazil (**Table 1**). A 60 year-old woman residing in Rio de Janeiro, Brazil presenting arterial hypertension and diabetes mellitus was admitted to HUPE on September 22, 2012 for the investigation of fever, fatigue with mild exertion, aortic regurgitation and presence of vegetation on the noncoronary cuspid of the aortic valve. Fever began 30 days prior to admission. On August 22, 2012, she had cerebral transient ischemic attack without neurologic sequel. An epidemiologic antecedent condition occurred four months before hospitalization when she had her right third hand finger exposed to pricking by fishbone that remained injured till the day of hospitalization. In that opportunity the patient did not undergo surgery or dental procedures. On admission physical examination the patient was febrile (38.5°C), eupneic and with a divergent arterial pressure (140x46mm) without signs of Corrigan's pulse. On cardiac auscultation, she presented a heart rate sinus 84 beats per minute, clear aortic valve closure (A2) sound, diastolic murmur of moderate intensity heard best in the third intercostal space along the left sternal border. Multiplanar transesophageal and transthoracic echocardiographs showed left ventricular (LV) enlargement with LV volume overload, global and segmental VE systolic function preserved at rest, and a slightly thickened aortic valve with vegetation compatible image on the noncoronary cusp of the aortic valve measuring 14 mm (**Figure 1**). For the diagnosis of IE, the modified Duke criteria were incorporated to the echocardiography, history, and physical examination information. After admission to the Coronary Care Unit and considering the history of community acquired IE, the sub-acute evolution, the accident with herringbone and after three sets of peripheral blood were sent to microbiology laboratory, the patient was empirically treated with intravenous ampicillin-sulbactam (3.0g q6h) plus gentamicin (80 mg q8h). On the fourth day of antimicrobial therapy and cardiologic support, before having a **valve replacement surgery**, the patient presented sudden sweating and hypotension, being evidenced by electrocardiogram ST-segment elevation in DII, DII, a VF and V6, reaching a maximum of 5 mm in DIII and ST-segment depression

in V2, V3 and V4, consistent with acute infero-dorso-lateral myocardial infarct. Urgent catheterization was performed along with thrombolysis with alteplase, but had to be interrupted because of refractory hypotension. The patient suffered cardiac arrest and was unresponsive to resuscitation procedures.

Six sets of blood cultures yielded slow bacterial growth (BacT/ALERT 3D, BioMérieux, Durham, NC, USA). Since normal sheep blood agar plates may not support the growth of *Abiotrophia*, the suspect clinical isolates were cultured on sheep blood agar with 0.001% pyridoxal (vitamin B6) at 35°C/48-72 h of incubation in an aerobic environment supplemented with 5 to 10% carbon dioxide. Gram-positive coccobacilli in chains (**Figure 2**) showed small dysmorphic alpha-hemolytic pinpoint colonies that gave negative results for catalase, oxidase, indol and H<sub>2</sub>S tests [1].

Phenotypic characterization performed by the API-Coryne System V3.0 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) identified all four clinical isolates as *Erysipelothrix rhusiopathiae* by the API codes 4 4 0 0 0 0 0 (95.0% probability, T=0.53) and 0 4 0 0 0 0 0 (81.4% probability, T=0.53). A low plausibility of identification was also observed for the Vitek 2 System (GP card): *Alloiococcus otitis* / *Granulicatella elegans* (7057 and 7059 isolates), *Gemella sanguinis* / *G. elegans* (7058 isolate) and *G. elegans* (7060 isolate).

Molecular characterization of isolates was accomplished by 16S rRNA gene sequencing. DNA extraction, primer design, gene amplification by PCR, and sequencing of amplified PCR products were performed as previously described [14]. Sequencing reactions were performed with BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI-3730 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) by standard protocols. The 16S rRNA gene sequences were compared to those available in the National Center for Biotechnology Information Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST algorithm and the Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu>). The 16S rRNA genes sequences were deposited in GenBank database whose access numbers are: KF574953; KF574954, KF574955 and KF574956. The 16S rRNA sequences from the clinical isolates exhibited the highest similarity values to the type strain of *A. defectiva* (ATCC 49176), ranging from 98.96%-99.12%.

Antibiotic susceptibilities to penicillin, erythromycin and vancomycin of *A. defectiva* clinical isolate were interpreted according to Ratcliffe and co-workers [15].



The minimal inhibitory concentrations (MIC) of penicillin, erythromycin and vancomycin were 0.032 µg/mL, 0.06 µg/mL and 0.25 µg/mL, respectively.

## DISCUSSION

To our knowledge this is the first reported case in Brazil of fatal aortic valve IE due to *Abiotrophia defectiva* in an elderly patient without previous heart disease. The patient gave history of diabetes mellitus, cerebral transient ischemic and pricking by fishbone.

Recently, an increasing **number** of case reports described *A. defectiva* isolates recovered from **invasive and noninvasive infections**, during particular characteristics including dental procedures [4, 10]. *A. defectiva* infection mostly had occurred in immunocompromised patients although infection was also observed in an immunocompetent patient [16].

While IE due to *A. defectiva* was the most commonly reported illness, a variety of other manifestations have been increasingly described, including endophthalmitis, joint and **central nervous system** infections [17, 18, 19].

Some studies have estimated that *A. defectiva* is responsible for 5-6% of all cases of IE and streptococcal endocarditis [1]. There are several case reports of IE caused by *A. defectiva* in the literature, including children with no underlying heart disease [20]. *Abiotrophia* endocarditis was associated with a high rate of embolization and treatment failure. Neurological complications occurred in 20% to 40% of these cases, including subarachnoid hemorrhage and/or mycotic aneurysm [13].

After an extensive search in MEDLINE over the past 13 years, we found ten well documented cases of endocarditis caused by *A. defectiva* in developing countries with identification of bacterial species (**Table 1**). Evaluation of patients risk factors, antimicrobial therapy administered, sites of infection, complications and outcomes indicated that the cases occurred in three females and seven males, with a mean age of 39 years (age range 10-66 years old). Three patients were children under 12 years of age; two had **no underlying cardiac disease as previously described by** Bhat and co-workers [20]. Half of the patients had a history of heart disease, such as rheumatic heart disease and mitral valve prolapse and 80%, the

mitral valve was the site of infection. Five patients had complications due to IE, such as mycotic aneurism associated subarachnoid hemorrhage, heart failure and emboli. All patients were treated with appropriate antimicrobial combination chemotherapy and showed no relapse after surgery and / or treatment. In the present case report, the patient died despite having been treated with intravenous ampicillin-sulbactam plus gentamicin.

*A. defectiva* may commensally **colonize** the **cutaneous and mucosal surfaces** of humans [1]. Since the patient had a hand finger exposed to pricking by fishbone that remained injured till the day of hospitalization, we performed a literature search of infections, especially endocarditis, associated with pricking by fishbone and we did not find the involvement of *A. defectiva* in any of the reported cases.

*A. defectiva* is often associated with negative blood cultures due to the fastidious growth [4]. Because of its infrequent isolation, laboratory personnel are often unfamiliar with *A. defectiva*. Furthermore, its pleomorphic coccobacillar appearance and fastidious growth conditions make this organism difficult to identify, and biochemical techniques generally fail to classify it [1]. *A. defectiva*, when grown under suboptimal conditions, can easily be mistaken for a Gram-positive rod on Gram stain, it should be included in algorithms used to identify Gram-positive rods [17]. Because the Gram stain, in this study, the clinical isolates were mistakenly identified by the API-Coryne system as *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Clinical isolates were subjected to other phenotypic characterization including Vitek 2 System (GP card) showed the presence NSV. However, biochemical testing has been reported to lead to misidentification this microorganism [1, 17]. In the present study, four *A. defectiva* isolates were of low discrimination with *Alloiococcus otitis*, *Granulicatella elegans*, *Gemella sanguinis* by biochemical testing in Vitek 2 system. Our findings are in agreement with Ratcliffe and co-workers [15] that demonstrated the limitations of the Vitek 2 system in the identification of NVS. 16S rRNA gene sequencing provided genus and species identification for clinical isolates. The molecular approach has been useful tool in diagnosing infection with this fastidious microorganism that can easily be misidentified using phenotypic identification methods.

## Conclusions

In this report, we describe a patient with IE caused by *A. defectiva* in an attempt to increase awareness about this organism and to highlight the difficulties encountered in the diagnosis and in the treatment. In case of subacute IE endocarditis, especially when etiology is difficult to detect, *A. defectiva* should be suspected. Similar to observations of Bhat and co-workers [20], our case highlight special challenges in management of *Abiotrophia* endocarditis cases. Nutritional supplementation of the growth media and/or newer 16S ribosomal RNA gene sequencing may be necessary to identify *Abiotrophia* as the causative organism. Specific antimicrobial therapy and continued surveillance are needed to prevent the significant morbidity and mortality associated with this infection.

## Acknowledgements

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

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists

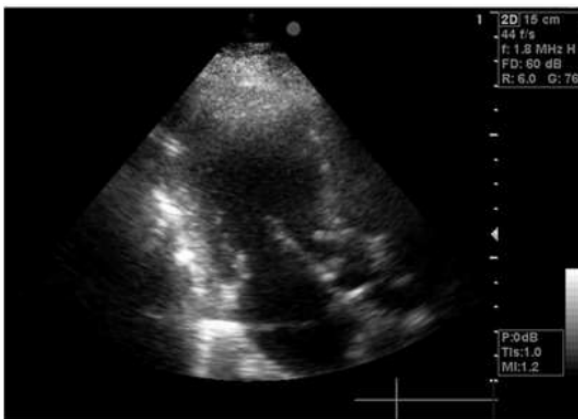
## References

1. Ruoff KL. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and Other Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington, DC. 2011. pp 365-378.
2. Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997; 47:590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>. Accessed 17 Dec 2013.
3. Christensen JJ, Facklam RR. *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. J Clin Microbiol. 2001; 39:3520-23.
4. Lainscak M, Lejko-Zupanc T, Strumbelj I, Gasparac I, Mueller-Premru M, Pirs M. Infective endocarditis due to *Abiotrophia defectiva*: A report of two cases. J Heart Valve Dis. 2005; 14:33-36.

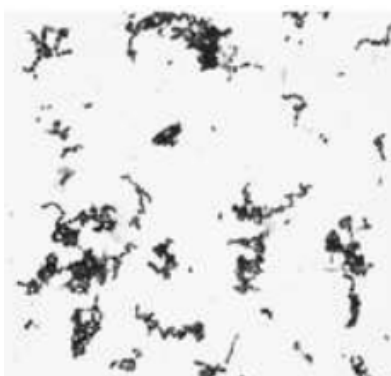
5. Yemisen M, Koksal F, Mete B, Yarimcam F, Okcun B, Kucukoglu S, Samasti M, Kocazeybek B, Ozturk R. *Abiotrophia defectiva*: a rare cause of infective endocarditis. Scand J Infect Dis. 2006; 38:939-41.
6. Phulpin-Weibel A, Gaspar N, Emirian A, Chachaty E, Valteau-Couanet D, Gachot B. Intravascular catheter-related bloodstream infection caused by *Abiotrophia defectiva* in a neutropenic child. J Med Microbiol. 2013; 62:789-791.
7. Hoen B, Duval X. Clinical practice. Infective endocarditis. N Engl J Med. 2013; 368:1425-33.
8. Verghese, S, Mullasari A, Padmaja P, Mathew T, Elizabeth SJ, Chitra AK, Anitha A, Maria CF, Cherian KM. Bacterial endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* (Nutritionally Variant Streptococci). Indian Heart J. 2000; 52:594-596.
9. Ray M, Subramanian C, Ray P, Singhi P. Infective endocarditis in a child due to *Abiotrophia defectiva*. Indian Pediatr. 2002; 39:388-392.
10. Chang HH, Lu CY, Hsueh PR, Wu MH, Wang JK, Huang LM. Endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* in children. Pediatr Infect Dis J. 2002; 21:697-700.
11. Porte LT, Zamorano JR, Pavéz DA, Monckeberg GF, Varela CA, González PA, Ulloa TF, Sepúlveda CR. Endocarditis por *Abiotrophia defectiva* en paciente adulto / Endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* in an adult patient. Rev Chil Infectol. 2004; 21:151-155.
12. Lin, CH; Hsu, RB. Infective endocarditis caused by nutritionally variant streptococci. Am. J. Med. Sci. 2007; 334:235-239.
13. Yang YS, Shang ST, Lin JC, Chiu CH, Chang FY. A ruptured cerebral mycotic aneurysm by *Abiotrophia defectiva* endocarditis. Am. J. Med. Sci. 2010; 339:190-191.
14. Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TC, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108:23-9.
15. Ratcliffe P, Fang H, Thidholm E, Boräng S, Westling K, Özenci V. Comparison if MALDI-TOF MS and VITEK2 system for laboratory diagnosis of *Granulicatella* and *Abiotrophia* species causing invasive infections. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 77:216-9.
16. Anderson HM, Miller C, Kemp E, Huntington MK. Bullous impetigo associated

- with *Abiotrophia defectiva* in an immunocompetent adult. J Med Microbiol. 2012; 61:1029-1031.
17. Rozemeijer W, Jiya TU, Rijnsburger M, Heddema E, Savelkoul P, Ang W. *Abiotrophia defectiva* infection of a total hip arthroplasty diagnosed by 16S rRNA gene sequencing. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 70:142-4.
  18. Lee MH, Lawlor M, Lee AJ. *Abiotrophia defectiva* Bleb-associated endophthalmitis confirmed with 16S ribosomal RNA sequencing. Glaucoma. 2013; Aug 21[Epub ahead of print].
  19. Tena D, Solís S, Lainez S, Torralba M, Chacón P, Valdezate S, Sáez-Nieto JA, Bisquert J. Meningitis caused by *Abiotrophia defectiva*: case report and literature review. Infection. 2013; 41:571-4.
  20. Bhat DP, [Nagaraju L](#), [Asmar BI](#), [Aggarwal S](#). *Abiotrophia* endocarditis in children with no underlying heard disease: a rare but virulent organism. Congenit Heart Dis. 2013; May 20. doi: 10.1111/chd.12095. [Epub ahead of print]

### Figure legend



**Figure 1.** Infective endocarditis due to *Abiotrophia defectiva*. Transthoracic echocardiogram (TTE) showed peduncular vegetation in ventricular side of non-coronary aortic valve cuspid, with 14 mm diameter.



**Figure 2.** Microscopic morphology of *Abiotrophia defectiva* revealing pleomorphic Gram-positive coccobacilli. Magnification 1,000 X.

## APÊNDICE C – Trabalho apresentado em congresso

**Table 1.** Case reports of infective endocarditis due to *Abiotrophia defectiva* in developing countries ( $n=11$ )

Country/Reference	Age(y)/ Sex <sup>1</sup>	Epidemiological relation	Previous heart disease	Site of infection/ Vegetation size/ Surgery	Therapy <sup>2</sup>	Penicillin susceptibility/ MIC	Complication s	Outcome
Brazil/2014 This study	60/F	Pricking by fishbone; Cerebral transient ischemic; Diabetes mellitus; Subarachnoid hemorrhage and hydrocephalus	None	Aortic/ 14 mm/Yes	AMP/SUL + GEN	Sensitive/ 0.032 µg/mL	Heart failure	Death
Taiwan/2010 [13]	60/M	None	NR <sup>3</sup>	Mitral/ NR/No	VA, P, GEN	NR	Mycotic aneurism	No relapse
	51/M	None	Mitral valve prolapse	Mitral/ <10mm/Yes	P, GEN	Sensitive/ NR	Splenic infarction	No relapse
Taiwan/2007 [12]	12/F	None	None	Mitral/ 11x3 mm/No	VA, GEN, TOB, RIF, CTX	Sensitive/ NR	None	No relapse
	65/M	None	Mitral regurgitation	Mitral/ 11x10 mm/Yes	P, GEN	Resistant/ 0.125 µg/mL	None	No relapse
	49/M	Diabetes mellitus	None	Aortic/ 15x16 mm/Yes	P, GEN, CEF	Sensitive/ 0.032 µg/mL	Heart failure	No relapse
Turkey/2006 [5]	66/F	Pancytopenia	Mitral valve replacement and tricuspidoplasty	Mitral/ 0.2x0.3 mm/No	AMP, GEN	Resistant/ 0.25 µg/mL	None	No relapse
Chile/2004 [11]	37/M	None	Aortic and mitral rheumatic valvulopathy	Mitral/ 20 mm/No	CEF, GEN, VA	NR	None	No relapse
Taiwan/2002 [10]	12/F	Dental procedures	NR	Mitral/ NR/No	VA, GEN, AMP, TOB, CTX, RIF	NR	Emboli	No relapse; mild to moderate mitral insufficiency
India/2001 [9]	10/M	None	None	Aortic/ NR/Yes	P, CL, GEN	NR	None	No relapse
India/2000 [8]	28/M	NR	Rheumatic heart disease	Mitral/ NR/Yes	AMP, AMK, CEF, GEN, CXM	NR	Congestive heart failure	No relapse

<sup>1</sup> F, female; M, male; <sup>2</sup> P, penicillin; AMP, ampicillin; AMP/SUL, ampicillin sulbactam; AMK, amikacin; CEF, ceftriaxone; CLO, cloxacilin; CTX, cefotaxime; CXM, cefuroxime sodium; GEN, gentamicin; RIF, rifampin; TOB, tobramycin; VA, vancomycin. <sup>3</sup> NR, Not reported;



## 27º CBM Congresso Brasileiro de Microbiologia

# Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado ABIOTROPHIA DEFECTIVA AORTIC VALVE ENDOCARDITIS ASSOCIATED TO PRICKING BY FISHBONE - A FIRST CASE REPORT IN BRAZIL com a autoria de: RAMOS, J. N., SIMPSON-LOUREDO, L., SANTOS, L. S., VIDAL, L. M. R., MOTA, H. F., SOUZA, C., LADEIRA, E. M., FARIA, Y. V., CAMELLO, T. C. F., SALGADO, A., MATTOS-GUARALDI, A. L., VIEIRA, V. V., HIRATA JR, R., DAMASCO, P. V. foi apresentado na forma de pôster durante o 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2013 realizado no Centro de Convenções de Natal, na cidade de Natal, RN, no período de 29 de setembro a 3 de outubro de 2013. De 29 de Setembro a 3 de Outubro de 2013 - Centro de Convenções de Natal - RN

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior  
Presidente

Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves  
1ª Secretária

#### Eventos paralelos:

- II Simpósio Iberoamericano sobre Micro-organismos Fotossintetizantes
  - XV Simpósio Brasileiro de Micobactérias
  - II Simpósio de Fermentação Alcoólica
- I Brazilian Microbiome Workshop and II Brazilian Microbiome Project Meeting
  - IV Simpósio de Coleções de Cultura

#### Organização e realização



## APÊNDICE D – Demais artigos publicados durante o mestrado.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(1): 23-29, February 2013 23

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

Paulo Victor Pereira Baio<sup>1,4,5</sup>, Higor Franceschi Mota<sup>1</sup>, Andréa D'ávila Freitas<sup>1,2</sup>, Débora Leandro Rama Gomes<sup>1,6</sup>, Juliana Nunes Ramos<sup>1,4</sup>, Lincoln Oliveira Sant'Anna<sup>1</sup>, Mônica Cristina Souza<sup>1</sup>, Thereza Cristina Ferreira Camello<sup>1,3</sup>, Raphael Hirata Junior<sup>1</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>4</sup>, Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia, Faculdade de Ciências Médicas <sup>2</sup>Unidade Docente Assistencial de Doenças Infecciosas e Parasitárias

<sup>3</sup>Laboratório de Bacteriologia, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>5</sup>Laboratório Químico Farmacêutico do Exército, Ministério da Defesa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>6</sup>Faculdade de Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

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

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



Antonie van Leeuwenhoek  
DOI 10.1007/s10482-013-0080-5

ORIGINAL PAPER

## *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles

Liliane Simpson-Louredo · Juliana Nunes Ramos · Renata Stavracakis Peixoto ·  
Louisy Sanches Santos · Camila Azevedo Antunes · Elisa Martins Ladeira ·  
Cintia Silva Santos · Veronica Viana Vieira · Maria Helena Simões Villas Bôas ·  
Raphael Hirata Jr. · Ana Lúcia Mattos-Guaraldi

Received: 2 September 2013 / Accepted: 15 November 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** *Corynebacterium ulcerans* has been increasingly isolated as an emerging zoonotic agent of diphtheria and other infections from companion animals. Since pets are able to act as symptomless carriers, it is also essential to identify virulence potential for humans of these isolates. In this work the ability of *C. ulcerans* to bind to fibrinogen (Fbg), fibronectin (Fn) and Type I collagen as well the genetic relationship among strains isolated from human and asymptomatic dogs in Rio de Janeiro (Brazil) were analyzed. Five pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles were demonstrated (I, II, III, IV and V). In addition, the IV and V profiles exhibiting  $\geq 85\%$  similarity were expressed by the BR-AD41 and BR-AD61 strains from companion dogs living in

the same neighborhood. Independent of the PFGE-types, human and dog isolates showed affinity to Fbg, Fn and collagen. Heterogeneity of PFGE profiles indicated endemicity of *C. ulcerans* in the Rio de Janeiro metropolitan area. Differences in the expression of adhesins to the human extracellular matrix may contribute to variations in the virulence and zoonotic potential of *C. ulcerans* strains.

**Keywords** *Corynebacterium ulcerans* · Dog · Fibrinogen · Fibronectin · PFGE

L. Simpson-Louredo and J. N. Ramos contributed equally for the first authorship in this manuscript.

# Molecular Identification of *Nocardia* Isolates from Clinical Samples and an Overview of Human Nocardiosis in Brazil

Paulo Victor Pereira Baio<sup>1,2,3</sup>, Juliana Nunes Ramos<sup>1,2</sup>, Louisy Sanches dos Santos<sup>1</sup>, Morgana Fonseca Soriano<sup>1</sup>, Elisa Martins Ladeira<sup>2</sup>, Mônica Cristina Souza<sup>1</sup>, Thereza Cristina Ferreira Camello<sup>1,4</sup>, Marcio Garcia Ribeiro<sup>5</sup>, Raphael Hirata Junior<sup>1</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>2\*</sup>, Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>

**1** Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia, Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica-LDCIC, Centro Colaborador para Difteria da CGLAB/SVS/MS, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Ministério da Defesa, Laboratório Químico Farmacêutico do Exército, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Laboratório de Bacteriologia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brazil

## Abstract

**Background:** *Nocardia* sp. causes a variety of clinical presentations. The incidence of nocardiosis varies geographically according to several factors, such as the prevalence of HIV infections, transplants, neoplastic and rheumatic diseases, as well as climate, socio-economic conditions and laboratory procedures for *Nocardia* detection and identification. In Brazil the paucity of clinical reports of *Nocardia* infections suggests that this genus may be underestimated as a cause of human diseases and/or either neglected or misidentified in laboratory specimens. Accurate identification of *Nocardia* species has become increasingly important for clinical and epidemiological investigations. In this study, seven clinical *Nocardia* isolates were identified by multilocus sequence analysis (MLSA) and their antimicrobial susceptibility was also determined. Most *Nocardia* isolates were associated to pulmonary disease.

**Methodology/Principal Findings:** The majority of Brazilian human isolates in cases reported in literature were identified as *Nocardia* sp. Molecular characterization was used for species identification of *Nocardia nova*, *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia asiatica* and *Nocardia exalbida/gamkensis*. Data indicated that molecular analysis provided a different *Nocardia* speciation than the initial biochemical identification for most Brazilian isolates. All *Nocardia* isolates showed susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole, the antimicrobial of choice in the treatment nocardiosis. *N. nova* isolated from different clinical specimens from one patient showed identical antimicrobial susceptibility patterns and two distinct clones.

**Conclusions/Significance:** Although Brazil is the world's fifth-largest country in terms of land mass and population, pulmonary, extrapulmonary and systemic forms of nocardiosis were reported in only 6 of the 26 Brazilian states from 1970 to 2013. A least 33.8% of these 46 cases of nocardiosis proved fatal. Interestingly, coinfection by two clones may occur in patients presenting nocardiosis. *Nocardia* infection may be more common throughout the Brazilian territory and in other developing tropical countries than is currently recognized and MLSA should be used more extensively as an effective method for *Nocardia* identification.

**Citation:** Baio PVP, Ramos JN, Santos LSd, Soriano MF, Ladeira EM, et al. (2013) Molecular Identification of *Nocardia* Isolates from Clinical Samples and an Overview of Human Nocardiosis in Brazil. PLoS Negl Trop Dis 7(12): e2573. doi:10.1371/journal.pntd.0002573

**Editor:** Todd Reynolds, University of Tennessee, United States of America

**Received:** June 13, 2013; **Accepted:** October 21, 2013; **Published:** December 5, 2013

**Copyright:** © 2013 Baio 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.

**Funding:** This work was supported by CAPES, FAPERJ, CNPq, PAPES V- FIOCRUZ/CNPq, SR-2/UERJ, and the Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD - CAPES/MEC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: vieira@ioc.fiocruz.br, veronicavianavieira@hotmail.com

## ARTICLE IN PRESS

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xxx (2013) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

## Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)<http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio>

## *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil<sup>☆</sup>

Paula Marcele Afonso Pereira<sup>a</sup>, Vanessa Batista Binatti<sup>a</sup>, Bruna Pinto Ribeiro Sued<sup>a</sup>, Juliana Nunes Ramos<sup>a,c</sup>, Renata Stavracakis Peixoto<sup>a,b</sup>, Cláudio Simões<sup>b</sup>, Eduardo Almeida de Castro<sup>a</sup>, José Luís Muniz Bandeira Duarte<sup>a</sup>, Verônica Viana Vieira<sup>c</sup>, Raphael Hirata Jr.<sup>a</sup>, Kátia Regina Netto Santos<sup>b</sup>, Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>a,\*</sup>, José Augusto Adler Pereira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

<sup>b</sup> Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>c</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS -Departamento de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 March 2013

Received in revised form 26 May 2013

Accepted 4 June 2013

Available online xxxx

## Keywords:

*Staphylococcus haemolyticus*

Multiresistance

PFGE

Biofilm

Neonates

Bacteremia

## ABSTRACT

Oxacillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* (ORSH) was found as the most prevalent (77.5%) species of coagulase-negative staphylococci associated with bacteremia in neonates making use of intravenous catheters in an intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. Thirty-one blood isolates were confirmed as *S. haemolyticus* by sequencing of the 16S and clustered in 6 pulsed-field gel electrophoresis types (with 58% of the strains belonging to 2 predominant types B and D). *S. haemolyticus* was mostly oxacillin-resistant (90.3%) displaying multiresistance profiles (70.4%). However, the *mecA* gene was undetected in 22.6% strains. ORSH exhibited slime production on Congo-Red agar (67.7%), adherence to polystyrene (96.7%), and glass (87%) surfaces. Interestingly, *ica*-operon was detected in 58% strains, mostly belonging to the B, D, and F genotypes, which is a significantly higher percentage when compared to other studies conducted at different parts of the globe. Data indicated that *ica* operon and biofilm-forming ORSH are endemic in Brazilian nosocomial environment.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.