

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

Juliana Nunes Ramos

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS EM *Corynebacterium striatum*

Rio de Janeiro

2018

Juliana Nunes Ramos

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DA
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *Corynebacterium striatum***

Tese apresentada ao curso de Doutorado do 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 do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras: Verônica Viana Vieira

Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Ramos, Juliana Nunes

Análise da diversidade genética e caracterização da resistência aos antimicrobianos em *Corynebacterium striatum*. / Juliana Nunes Ramos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

210 f. : il. , tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadoras: Verônica Viana Vieira; Ana Luiza de Mattos Guaraldi.

1. *Corynebacterium striatum*. 2. Resistência. 3. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas. 4. Ilhas Genômicas. 5. Tipagem de Sequências Multilocus. I. Título.

Analysis of genetic diversity and characterization of antimicrobial resistance in *Corynebacterium striatum*

Juliana Nunes Ramos

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DA
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *Corynebacterium striatum***

Tese apresentada ao curso de Doutorado do 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 do título de Doutor em Ciências.

Aprovado:

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Renata Cristina Picão (Doutora)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Robson de Souza Leão (Doutor)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Verônica Viana Vieira (Doutora) – Orientadora

Instituto Oswaldo Cruz

Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Doutora) - Orientadora

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Aos meus pais, por terem sido tão essenciais na
realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

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

Às Dras. Verônica Vieira e Ana Luiza Guaraldi, pela oportunidade de realização deste estudo, pela atenção, carinho, orientação e principalmente pelos ensinamentos que me permitiram esta conquista.

À Dra. Maria Helena Villas Boas, pela atenção e revisão desta tese e por toda a paciência comigo durante esses 6 anos de caminhada.

Aos professores da banca por terem aceitado o convite.

Aos queridos amigos Paulo Baio, João Veras e Elisa por terem sido tão prestativos e por me ajudarem sempre que precisei. Desde o mestrado vocês foram essenciais para a minha caminhada.

Às queridas amigas da CBAS, Talita, Izabel e Érica, obrigada pela companhia, atenção, disposição, prestatividade e todo suporte técnico.

Ao Michel Abanto, mesmo de longe, sempre atencioso e prestativo. Obrigada por todo o auxílio prestado. Espero que nossa colaboração perdure por longos anos!

Ao professor Rommel Thiago, pelo suporte na montagem dos genomas. Muito obrigada!

À minha família, em especial à minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu estivesse aqui. Vocês foram essenciais nesta caminhada. Obrigada pela constante presença, mesmo distantes.

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

“Decidi não esperar as
oportunidades e sim, buscá-las.
Decidi ver cada dia como uma nova
oportunidade de ser feliz.”

Walt Disney

RESUMO

Corynebacterium striatum é um bacilo Gram-positivo constituinte da microbiota de pele e mucosas, que tem emergido como patógeno multirresistente em surtos nosocomiais em diversos países. Em 2009, um surto nosocomial por estirpes multirresistentes de *C. striatum* isoladas principalmente de aspirado traqueal foi relatado no Hospital Universitário Pedro Ernesto, Rio de Janeiro, Brasil. Subsequentemente, um aumento no número de casos de infecções da corrente sanguínea e relacionadas ao cateter por estirpes multirresistentes de *C. striatum* foi observado. A investigação do relacionamento destas estirpes utilizando PFGE revelou a permanência do pulsotipo I multirresistente no ambiente hospitalar como clone invasivo. Neste estudo, dez estirpes de *C. striatum* foram selecionadas para o sequenciamento completo dos genomas visando a caracterização genética da resistência e a análise da diversidade. As abordagens de taxonomia genômica aplicadas às estirpes corroboraram a espécie *C. striatum*. As análises de genes constitutivos baseadas em três esquemas de MLST descritos para corinebactérias mostraram ser mais discriminatórios para as estirpes de *C. striatum*, quando comparadas com a tipagem utilizando PFGE, uma vez que as estirpes do pulsotipo I puderam ser diferenciadas. Além disso, este estudo verificou que a análise utilizando os genes do esquema de MLST para *C. diphtheriae*, foi mais discriminatório entre os três esquemas de MLST para corinebactérias utilizados. As análises genômicas mostraram que a detecção de genes de resistência aos antimicrobianos nas estirpes de *C. striatum* foi consistente com padrões de multirresistência observados nas diversas espécies de corinebactérias. Dados inéditos foram observados neste estudo como as relações das mutações nos genes constitutivos *folA* e *rpoB* e a resistência aos antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprim e rifampicina, além da relação direta do gene *bla* com o regulador negativo da expressão das beta-lactamases (BLR). Estirpes que carregam o gene *bla* e carecem do BLR apresentaram as maiores concentrações inibitórias mínimas para os beta-lactâmicos. A caracterização do contexto genômico dos genes de resistência e dos elementos genéticos móveis mostrou grande variabilidade entre as estirpes multirresistentes, de modo que foram observados contextos distintos, mesmo entre as estirpes do mesmo pulsotipo e paciente. As estirpes multirresistentes não compartilharam ilha genômica de resistência e a maioria dos genes de resistência não está localizada nestas estruturas genéticas. Genes envolvidos na replicação de plasmídeos não foram detectados, apesar de boa parte do conteúdo genético de resistência do plasmídeo pTP10 de *C. striatum* M82B ter sido encontrada nos genomas. Regiões completas de profagos foram detectadas em apenas uma estirpe, a única que não foi

detectado o sistema CRISPR-Cas, envolvido na defesa bacteriana contra DNA exógeno. As demais estirpes com regiões incompletas de profagos apresentaram o sistema CRISPR-Cas do tipo I-E e três estirpes também apresentaram um sistema do tipo I e subtipo desconhecido, corroborando a hipótese de que a presença de vários elementos genéticos nas células bacterianas pode levar a um gasto energético excessivo. O elevado número de cópias de sequências de inserção e a presença de diferentes elementos genéticos móveis demonstra a plasticidade dos genomas de *C. striatum* multirresistentes isolados de infecções nosocomiais invasivas, que impacta na propagação da resistência e no controle dessas infecções.

Palavras-chave: *C. Striatum*. Multirresistência. Mobiloma. CRISPR-Cas. Ilhas Genômicas. MLST.

ABSTRACT

Corynebacterium striatum is a Gram-positive rod constituent of the skin and mucosal microbiota, which has emerged as a multidrug-resistant (MDR) pathogen in nosocomial outbreaks in several countries. In 2009, a nosocomial outbreak by MDR *C. striatum* isolated mainly from tracheal aspirate was reported at University Hospital Pedro Ernesto, Rio de Janeiro, Brazil. Subsequently, an increase in the number of cases of bloodstream and catheter-related infections by MDR *C. striatum* was observed. The investigation of the relationship of these isolates by PFGE revealed the permanence of the MDR PFGE I profile in the hospital environment as invasive clones. In this study, 10 isolates of *C. striatum* were selected for the whole genome sequencing to the genetic characterization of resistance and diversity analysis. The genomic taxonomy approaches applied to the isolates corroborated the *C. striatum* species. The analyzes of housekeeping genes based on three MLST schemes described for corynebacteria shown to be more discriminatory when compared to typing by PFGE, since the PFGE I profile isolates could be differentiated. Furthermore, the analysis using the MLST scheme for *C. diphtheriae* was more discriminatory among the three MLST schemes for corynebacteria used. Genomic analyzes showed that detection of antimicrobial resistance genes in *C. striatum* isolates was consistent with multidrug resistance patterns observed in the various corynebacteria species. Inedited data were observed in this study, mutations in the *folA* and *rpoB* housekeeping genes and the resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and rifampicin antimicrobials, respectively, as well the direct relation of the *bla* gene with the negative regulator of beta-lactamase expression (BLR). The isolates positive to *bla* gene without BLR gene had the highest minimum inhibitory concentrations for beta-lactams antimicrobials. The characterization of the genomic context of the resistance genes and the mobile genetic elements showed great variability among the MDR isolates, so that different contexts were observed even between isolates of the same PFGE and patient. The MDR isolates did not share resistance genomic island and most resistance genes are not located in these genetic structures. Genes involved in plasmid replication were not detected, although much of the resistance genetic content of the plasmid pTP10 *C. striatum* M82B was found in the genomes. Complete regions of prophages were detected in only one isolate, the same in which the CRISPR-Cas system was not detect. The other isolates with incomplete prophage presented the CRISPR-Cas type I-E system and three isolates also presented an unknown CRISPR-Cas type I, corroborating the hypothesis that several genetic elements in the bacterial cells demonstrate an additional energy costs. The high number of copies of insertion

sequences and the presence of different mobile genetic elements demonstrates the plasticity of the MDR *C. striatum* genomes isolated from invasive nosocomial infections, which impacts the propagation of resistance and the control of these infections.

Key-words: *C. striatum*. Multidrug-resistance. Mobilome. CRISPR-Cas. Genomic Islands. MLST.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração das topoisomerases II e IV e suas respectivas subunidades.....	33
Figura 2 - Esquematização dos três estágios do processo de defesa bacteriana pelo sistema CRISPR-Cas.....	52
Figura 3 - Dendrograma gerado pelas análises DICE/UPGMA dos perfis de PFGE das estirpes de <i>C. striatum</i> isoladas de sítios intravenosos.....	75
Figura 4 - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. diphtheriae</i>	82
Figura 5a - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. diphtheriae</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo.....	84
Figura 5b - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. diphtheriae</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo e de outros países	85
Figura 5c - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. diphtheriae</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo, de outros países e de <i>C. simulans</i> como grupo de fora	86
Figura 6a - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. striatum</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo.....	87
Figura 6b - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. striatum</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo e de outros países.....	88
Figura 6c - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. striatum</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo, de outros países e de <i>C. simulans</i> como grupo de fora	89
Figura 7 – Região do operon ribossomal da cepa tipo de <i>C. striatum</i> ATCC 6940.....	90
Figura 8a - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. macginleyi</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo.....	91
Figura 8b - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. macginleyi</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo e de outros países.	92
Figura 8c - Árvore filogenética baseada nas sequências de genes constitutivos utilizados no esquema de MLST de <i>C. macginleyi</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo, de outros países e de <i>C. simulans</i> como grupo de fora	93
Figura 9 - Organização genética do transposon Tn5432 encontrado na estirpe 2130.....	97

Figura 10 - Contexto genômico do gene <i>ermX</i> das estirpes 2230 e 2237.....	98
Figura 11 - Contexto genômico do gene <i>ermX</i> das estirpes 2023 e 2308 (pulsotipo I) e 2038 (pulsotipo II).....	98
Figura 12 - Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene <i>ermX</i>	100
Figura 13 - Alinhamento da sequência de aminoácidos do gene <i>tetB</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo e da estirpe <i>C. striatum</i> M82B.....	107
Figura 14 - Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene <i>tetB</i> das nossas estirpes de <i>C. striatum</i> com as cepas tipo de <i>C. urealyticum</i> DSM 7109 e <i>C. singulare</i> IBS B52218. ...	107
Figura 15 - Contextos genômicos da região dos genes <i>tetAB</i>	109
Figura 16 - Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>tetW</i> das estirpes 2296 e 2425 com o isolado brasileiro <i>C. diphtheriae</i> BH8 e a cepa tipo <i>C. resistens</i> DSM 45100.....	110
Figura 17 – Mapa da distribuição das categorias em subsistemas da anotação automática pelo servidor <i>RAST</i>	113
Figura 18 – Contexto genômico do gene <i>bla</i>	115
Figura 19 - Organização genética do transposon Tn5564 da estirpe de <i>C. striatum</i> M82B... ..	117
Figura 20 – Comparação entre os Tn5564 encontrado no plasmídeo pTP10 de <i>C. striatum</i> M82B com as estirpes 2023 e 2130 deste estudo	118
Figura 21 – Contexto genômico do gene <i>cmx</i> nas estirpes 2230 e 2237	119
Figura 22 – Contexto genômico do gene <i>cmx</i> nas estirpes 2237, 2296 e 2308.....	120
Figura 23 - Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene <i>cmx</i>	121
Figura 24 – Contexto genômico dos genes <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> e <i>strB</i>	124
Figura 25 - Alinhamento dos genes 16S rRNA das estirpes de <i>C. striatum</i> e da cepa tipo da espécie	129
Figura 26 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ribossomal S12	130
Figura 27 - Árvore filogenética do gene <i>rpoB</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo e da cepa tipo de <i>C. striatum</i> ATCC 6940	132
Figura 28 - Alinhamento da sequência de aminoácidos do gene <i>rpoB</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> e da cepa tipo de <i>C. striatum</i> ATCC 6940	132
Figura 29 - Alinhamento da sequência completa de aminoácidos do gene <i>rpoB</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> , <i>C. diphtheriae</i> BH8 e outras cepas tipo de corinebactérias.....	134
Figura 30 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da região de resistência à rifampicina do gene <i>rpoB</i>	136
Figura 31 - Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene <i>rpoB</i>	137
Figura 32 – Localizações dos genes <i>folP</i> e <i>folA</i> no cromossomo da estirpe 2296.....	140

Figura 33 – Integrons das estirpes 2130, 2296, 2425	143
Quadro 1 -Sequências de inserção encontradas pelo uso do programa <i>ISfinder</i> nas estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo.....	145
Figura 34 – Comparação dos genomas de <i>C. striatum</i> deste estudo com o plasmídeo pTP10 <i>C. striatum</i> M82B.....	149
Figura 35 – Comparação dos genomas de <i>C. striatum</i> deste estudo com o plasmídeo pJA144188 da cepa tipo de <i>C. resistens</i> DSM 45100	151
Figura 36 – Comparação dos genomas de <i>C. striatum</i> deste estudo com o plasmídeo pNG2 de <i>C. diphtheriae</i> S601	152
Figura 37 – Representação das ilhas genômicas de resistência putativas presentes em algumas estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo preditas pelo programa <i>GIPSy</i>	154
Figura 38 – Comparação dos genomas de <i>C. striatum</i> deste estudo com a estirpe <i>C. striatum</i> Kc-Na-01	156
Figura 39 – Categorização funcional dos genes de <i>C. striatum</i> anotados pelo servidor <i>RAST</i>	157
Figura 40 – Profagos intactos encontrados na estirpe 1954 pelo algoritmo <i>Phaster</i>	158
Figura 41 – Comparação entre os genomas dos profagos 1 e 2 encontrados na estirpe 1954.....	159
Figura 42 – Comparação entre os genomas dos profagos 1 e 2 encontrados na estirpe 1954 com o fago incompleto da estirpe multirresistente de <i>C. striatum</i> 216.....	160
Figura 43 – Comparação dos genomas de <i>C. striatum</i> evidenciando as duas regiões de profagos na estirpe 1954.....	161
Figura 44 – Região <i>cluster</i> com o <i>locus</i> Cas tipo I-E encontrado em nove estirpes	169
Figura 45 - Região <i>cluster</i> com o <i>locus</i> Cas tipo I' encontrado nos genomas das estirpes 2023, 2038 e 2308	170
Figura 46 – Análise comparativa do sistema CRISPR-Cas entre as estirpes 2237 e 2230	172

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Abordagens taxonômicas empregadas para avaliar a relação das estirpes clínicas de *C. striatum* utilizando o genoma *draft* da cepa tipo como modelo delineador 78

Gráfico 2 - Abordagens taxonômicas empregadas para avaliar a relação das estirpes clínicas de *C. striatum* utilizando o genoma completo da estirpe de *C. striatum* 216 como modelo lineador 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os documentos do CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017) mostrando os agentes antimicrobianos contemplados em cada documento.....	30
Tabela 2 - Dados das 21 estirpes de <i>C. striatum</i> utilizadas neste estudo	60
Tabela 3 – Iniciadores utilizados para as reações de amplificação e sequenciamento dos genes de resistência e de enzimas realizados neste estudo	63
Tabela 4 - Antimicrobianos utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das estirpes de <i>C. striatum</i>	66
Tabela 5 – Genes constitutivos do esquema de MLST de <i>C. diphtheriae</i> utilizados na construção da árvore filogenética nas análises de MLSA das estirpes de <i>C. striatum</i> deste estudo.....	69
Tabela 6 – Genes constitutivos utilizados na construção das árvores filogenéticas nas análises de MLST, baseadas nos esquemas de MLST para as espécies <i>C. macginleyi</i> e <i>C. striatum</i> ...	70
Tabela 7 - Pesquisa dos genes de resistência e integrase por PCR.....	73
Tabela 8 – Dados das estirpes de <i>C. striatum</i> isoladas no surto ocorrido no Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.....	76
Tabela 9 – Métricas dos sequenciamentos realizados nas plataformas Illumina Hiseq 2500 e Ion Torrent.....	77
Tabela 10 - Resultados das análises de AAI das estirpes de <i>C. striatum</i> utilizando a cepa tipo ATCC 6940 como referência.....	79
Tabela 11 – Resultados das análises de AAI das estirpes de <i>C. striatum</i> utilizando o genoma completo da estirpe clínica 216 isolada nos Estados Unidos	81
Tabela 12 – Resultados encontrados nos bancos de dados de genes de resistência	95
Tabela 13 – Correlação entre a presença do gene <i>ermX</i> e a CIM dos antimicrobianos clindamicina e eritromicina nas diferentes estirpes deste estudo e na cepa tipo de <i>C. striatum</i> ATCC 6940.....	96
Tabela 14 – Relação entre as mutações na região QRDR do gene <i>gyrA</i> e as CIMs para as 21 estirpes de <i>C. striatum</i>	102
Tabela 15 – Pontos de corte para quinolonas descritos nos documentos CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017).....	103
Tabela 16 - Relação entre as mutações na região QRDR do gene <i>gyrA</i> e as CIM para as estirpes de <i>C. striatum</i> com genoma sequenciado.....	104

Tabela 17 – Pontos de corte para tetraciclina descritos nos documentos CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017).....	106
Tabela 18 – Resultados das CIM dos diferentes beta-lactâmicos. Interpretação dos resultados de acordo com os pontos de corte obtidos no documento M45-A2 do CLSI (2010)	112
Tabela 19 – Genes BLR e <i>bla</i> (<i>BL</i>) encontrados nas estirpes deste estudo.....	115
Tabela 20 – Relação entre a mutação na posição 799 do operon ribossomal 16S com a presença dos genes <i>strA-strB</i> e o perfil de suscetibilidade à estreptomicina de dez estirpes desse estudo e da cepa tipo de <i>C. striatum</i> ATCC 6940.....	125
Tabela 21 – Correlação entre a presença do gene <i>aph(3')-Ia</i> e a CIM dos antimicrobianos gentamicina e amicacina nas estirpes e na cepa tipo ATCC 6940	127
Tabela 22 – Pontos de corte para aminoglicosídeos descritos nos documentos CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017).....	127
Tabela 23 – Relação entre a mutação na posição 1406 do operon ribossomal 16S e a presença do gene <i>aph(3')-Ia</i> e os perfis de suscetibilidade à gentamicina e amicacina de dez estirpes desse estudo e da cepa tipo de <i>C. striatum</i> ATCC 6940	128
Tabela 24 – Resultados da CIM de rifampicina (mg/L) adicionadas às análises do <i>rpoB</i>	133
Tabela 25 – Sequências dos iniciadores desenhados para a amplificação e sequenciamento da região de resistência à rifampicina do gene <i>rpoB</i>	135
Tabela 26 – Relação entre as mutações na região do gene <i>rpoB</i> possivelmente envolvida na resistência à rifampicina e as CIM para rifampicina das estirpes e cepas tipo de corinebactérias.....	138
Tabela 27 – Relação entre a CIM do sulfametoxazol associado ao trimetoprim (1/19) e as mutações encontradas no gene <i>folA</i> das estirpes de <i>C. striatum</i> desse estudo e da cepa tipo de <i>C. striatum</i> ATCC 6940.....	141
Tabela 28 – Lista dos genes <i>rep</i> de plasmídeos de <i>Corynebacterium</i> spp.	147
Tabela 29 - Resultados encontrados pelo <i>CRISPRfinder</i>	163

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AAC	<i>acyl-coenzyme A-dependent acetyltransferase</i>
AAI	<i>Average amino acid identity</i>
<i>Adk</i>	gene codificador da enzima adenilato quinase
<i>ampC</i>	gene codificador da enzima da classe C das beta-lactamases
ANI	<i>Average nucleotide identity</i>
ANT	<i>nucleoside triphosphate-dependent nucleotidyltransferase</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APH	<i>nucleoside triphosphate-dependent phosphotransferase</i>
<i>aspA</i>	gene codificador da enzima fumarato hidratase
ATP	adenosina trifosfato
<i>atpA</i>	gene codificador da Cadeia alfa da enzima ATP sintase
BGPI	bastonetes Gram-positivos irregulares
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>bla</i>	gene codificador da serina hidrolase pertencente à classe A das beta-lactamases
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>Blastn</i>	alinhamento local que compara nucleotídeos
<i>Blastx</i>	alinhamento local que utiliza os nucleotídeos como <i>query</i> , que são traduzidos em 6 quadros de leitura e comparados com um banco de dados de proteínas
BLR	regulador negativo da expressão das beta-lactamases
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CAB	<i>Columbia agar base</i>
CBAS	Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDS	sequência codificante
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
cm	centímetros
<i>cmx</i>	gene codificador da proteína de resistência ao cloranfenicol
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPR-Cas	<i>CRISPR associated proteins</i>
crRNA	RNA ribossomal CRISPR

CTI	Centro de Terapia Intensiva
DDH	hibridização DNA-DNA
<i>dfr</i>	gene codificador da enzima dihidrofolato redutase
DHFR	enzima dihidrofolato redutase
DHPS	enzima dihidropteroato sintase
<i>dnaA</i>	gene codificador da proteína de iniciação da replicação
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>dnaE</i>	gene codificador da subunidade alfa da enzima DNA polimerase III
<i>dnaK</i>	gene codificador da proteína chaperona
DNase	desoxirribonuclease
<i>dtxR</i>	<i>diphtheria toxin repressor</i>
EDTA	etilenodiamina tetra acético
<i>ermX</i>	<i>erythromycin ribosome methylat ion</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GC	guanina e citosina
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>folA</i>	gene codificador da enzima dihidrofolato redutase
<i>folP</i>	gene codificador da enzima dihidropteroato sintase
<i>fusA</i>	gene codificador do fator de alongamento G
G	força gravitacional
<i>gltA</i>	gene codificador da enzima citrato sintase
<i>gyrA</i>	gene codificador da subunidade A da enzima girase
<i>gyrB</i>	gene codificador da subunidade B da enzima girase
H	horas
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
<i>icd</i>	gene codificador da enzima isocitrato dehidrogenase
ICE	elementos conjugativos integrativos
INCQS	Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde
<i>intI</i>	gene codificador da integrase de classe I
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRAS	infecções relacionadas à assistência em saúde
ITS	região interespaçadora (genes 16S-23S)
kb	kilobases

L	litro
LDCIC	Laboratório de Corinebactérias de Importância Clínica
<i>leuA</i>	gene codificador da enzima 2-isopropilmalato sintase
M	molar
MBL	enzima metatobeta-lactamases
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
Mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min.	minutos
mL	mililitro
MLSA	análise de Sequências de Múltiplos <i>loci</i>
MLSB	macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mM	milimolar
mol.	moles
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
NAT	N-acetiltransferase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
NI	não informado
NR	não realizado
<i>odhA</i>	gene codificador dos componentes E1 e E2 da enzima 2-oxoglutarato dehidrogenase
ORF	<i>open reading frame</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	ácido para-aminobenzóico
<i>parC</i>	gene codificador da subunidade A da topoisomerase IV
<i>parE</i>	gene codificador da subunidade B da topoisomerase IV
PAI	ilhas de patogenicidade
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
PBP	<i>penicillin-binding proteins</i>

PCR	reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
<i>purA</i>	gene codificador da enzima adenylosuccinato sintase
QRDR	região determinante de resistência às quinolonas
<i>repA</i>	gene codificador da proteína de replicação de plasmídeos
<i>repB</i>	gene codificador da proteína de replicação de plasmídeos
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RND	<i>Resistance nodulation cell division</i>
rpm	rotações por minuto
<i>rpoB</i>	gene codificador da subunidade beta da RNA polimerase
RPP	<i>ribosomal protection proteins</i>
<i>rpsL</i>	gene codificador da proteína S12 da subunidade ribossomal 30S
RRDR	região determinante de resistência à rifampicina
rrn	operon ribossomal
rrs	16S rRNA
rRNA	RNA ribossomal
s	segundos
SI	sequências de inserção
SNP	polimorfismos de nucleotídeo único
spp.	espécies
ST	<i>Sequence type</i>
<i>strA</i>	gene codificador da enzima fosfotransferase de resistência à estreptomicina
<i>strB</i>	gene codificador da enzima fosfotransferase de resistência à estreptomicina
<i>sul1</i>	gene codificador da enzima dihidropteroato sintase
<i>sul2</i>	gene codificador da enzima dihidropteroato sintase
<i>sul3</i>	gene codificador da enzima dihidropteroato sintase
S12	proteína ribossomal
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TE	tampão tris-HCl-EDTA
Taq	DNA polimerase isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
<i>tetA</i>	gene codificador da subunidade A da proteína de resistência às tetraciclina

<i>tetB</i>	gene codificador da subunidade B da proteína de resistência às tetraciclina
<i>tetM</i>	gene codificador da proteína de resistência às tetraciclina
<i>tetO</i>	gene codificador da proteína de resistência às tetraciclina
<i>tetW</i>	gene codificador da proteína de resistência às tetraciclina
Tn	transposon
<i>tox</i>	gene codificador da toxina diftérica
tRNA	RNA transportador
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
U	unidades
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	unidade formadora de colônia
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPA	Universidade Federal do Pará
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
V	volts
ΔT_m	diferença entre as temperaturas de <i>melting</i>
β	beta
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
16S rRNA	RNA ribossomal 16 svedberg
23S rRNA	RNA ribossomal 23 svedberg
5S rRNA	RNA ribossomal 5 svedberg

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 O gênero <i>Corynebacterium</i>	24
1.2 <i>Corynebacterium striatum</i>	26
1.3 A resistência aos antimicrobianos em corinebactérias	28
1.3.1 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B	31
1.3.2 Resistência às quinolonas	32
1.3.3 Resistência às tetraciclinas	34
1.3.4 Resistência aos beta-lactâmicos	36
1.3.5 Resistência ao cloranfenicol	37
1.3.6 Resistência aos aminoglicosídeos	38
1.3.7 Resistência à daptomicina	39
1.3.8 Resistência aos antimicrobianos rifampicina e cotrimoxazol	40
1.4 Mobiloma	42
1.4.1 Integrons	43
1.4.2 Elementos de transposição	44
1.4.3 Plasmídeos	45
1.4.4 Ilhas genômicas	46
1.4.5 Bacteriófagos ou fagos	49
1.4.6 Elementos CRISPR	50
1.5 Tipagem molecular por <i>pulsed field gel electrophoresis</i>	53
1.6 Tipagem molecular por <i>multilocus sequence typing</i>	54
1.7 Sequenciamento genômico da nova geração	54
1.8 Taxonomia genômica	55
1.9 Justificativa	57
2 OBJETIVOS	59
2.1 Geral	59
2.2 Específicos	59
3 METODOLOGIA	60
3.1 Conservação das estirpes e preparo da cultura bacteriana	60
3.2 Pesquisa dos genes de resistência e integrase	61
3.2.1 Extração do DNA total	61
3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase	62

3.2.3 Eletroforese em gel de agarose a 1,5%	63
3.2.4 Purificação dos produtos da PCR	63
3.2.5 Determinação das sequências nucleotídicas	64
3.3 PFGE.....	65
3.4 Análise fenotípica da resistência	65
3.5 Sequenciamento dos genomas.....	67
3.5.1 Extração do DNA Genômico para o sequenciamento de alta vazão	67
3.5.2 Sequenciamento e montagem dos genomas	67
3.6 Ferramentas de bioinformática	68
3.6.1 Abordagens <i>in silico de</i> taxonomia genômica.....	68
3.6.2 Tipagem molecular por MLST	69
3.6.3 Pesquisa dos genes de resistência nos genomas	70
3.6.4 Pesquisa do mobiloma	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1 Pesquisa dos genes de resistência e da integrase por PCR	73
4.2 PFGE.....	74
4.3 Sequenciamento genômico de alta vazão.....	75
4.3.1 Métricas do sequenciamento e anotação dos genomas.....	76
4.4 Taxonomia genômica.....	78
4.5 Tipagem molecular por MLST x tipagem molecular por PFGE	83
4.5.1 Esquema de MLST de <i>C. diphtheriae</i>	83
4.5.2 Esquema de MLST de <i>C. striatum</i>	87
4.5.3 Esquema de MLST de <i>C. macginleyi</i>	91
4.6 Análise fenotípica da resistência	94
4.7 Caracterização genética da resistência	95
4.7.1 Resistência aos macrolídeos e lincosamidas (MLSB)	96
4.7.2 Resistência às quinolonas	101
4.7.2.1 Gene <i>gyrA</i>	101
4.7.2.2 Genes <i>gyrB</i> e <i>parC</i> e <i>parE</i>	105
4.7.2.3 Genes de resistência mediados por plasmídeos e bombas de efluxo	105
4.7.3 Resistência às tetraciclinas	105
4.7.4 Resistência aos beta-lactâmicos.....	111
4.7.5 Resistência ao cloranfenicol	117
4.7.6 Resistência aos aminoglicosídeos	122

4.7.7 Resistência à rifampicina.....	131
4.7.8 Resistência à sulfonamida associada ao trimetoprim	139
4.7.9 Pesquisa do mobiloma	142
4.7.9.1 <i>Integrans</i>	142
4.7.9.2 <i>Sequências de inserção</i>	143
4.7.9.3 <i>Plasmídeos</i>	147
4.7.9.4 <i>Ilhas genômicas de resistência</i>	153
4.7.9.5 <i>Fagos</i>	156
4.7.9.6 <i>Sistema CRISPR-Cas</i>	162
5 CONCLUSÕES	174
REFERÊNCIAS	177
APÊNDICE – MANUSCRITOS PRODUZIDOS COM ESTE TRABALHO COMO PRIMEIRA AUTORA	205
ANEXO A - TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>C. STRIATUM</i>	206
ANEXO B - ABORDAGENS TAXONÔMICAS APLICADAS À ESTIRPE <i>C. STRIATUM</i> KC-NA-01	208

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* pertence à classe *Actinobacteria* e representa um grupo diverso de bactérias Gram-positivas, com um alto conteúdo GC no DNA (variando de 51 a 63% mol.), possuindo parede celular composta por arabinose, galactose, ácido mesodiaminopimérico 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 valores de índice GC maiores que 65% mol. (BERNARD, 2012, FUNKE; BERNARD, 2011, KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2004, OLENDER, 2012).

De acordo com a publicação mais recente da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (PARTE, 2018), atualmente são 131 espécies descritas, muitas 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*, *Corynebacterium striatum* e outros (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 também vem sendo isolado de infecções invasivas, como endocardite, sepse, osteomielite, artrite, entre outras (FERNANDEZ-GUERRERO et al, 2013, PEIXOTO et al, 2014, SCHRODER et al, 2012, TORRES et al, 2013).

As corinebactérias (*coryne* = clava) tendem a ser claviformes quando expostas a meios artificiais de cultura. São anaeróbias facultativas, apresentam metabolismo fermentativo de carboidratos e não são 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 (CHUNG et al, 2008; FUNKE; BERNARD, 2011; RENOM et al, 2007).

As corinebactérias pertencem à microbiota da pele e de mucosas e encontram-se amplamente disseminadas no meio ambiente. Têm sido crescentes 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 estirpes 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 manifestações 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, 2003, FUNKE; BERNARD, 2011, MARTINS et al, 2009).

Com exceção de *C. diphtheriae*, a patogenicidade de outras corinebactérias de espécimes clínicas tem sido subestimada por vários anos. O melhor reconhecimento taxonômico das corinebactérias em espécimes clínicos e o aumento de relatos de casos associando-as com infecções em humanos e também em animais mudou esta visão nas últimas décadas. 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 (BELMARES et al, 2007, GUERRERO et al, 2012, KNOX; HOLME, 2002, OLENDER, 2012). No Brasil, há relatos de casos endocardite causados por *C. diphtheriae* toxigênicos e atoxigênicos (ENCINAS et al, 2015, HIRATA et al, 2008).

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. Entretanto, na maioria dos laboratórios esses patógenos permanecem sendo descartados como meros contaminantes (BALCI; EKSI; BAYRAM, 2002, OLENDER, 2012, PETIT et al, 1994, ROY; AHMAD, 2016). Portanto, estes micro-organismos devem ser valorizados quando isolados (i) a partir de sítios normalmente estéreis, com exceção se recuperados apenas em um de vários espécimes colhidos; (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 (BERNARD, 2012, YANAI et al, 2018).

O aumento do número de pacientes imunocomprometidos e o uso de dispositivos invasivos tem elevado a importância clínica dos bastonetes Gram-positivos em bacteremias, incluindo as causadas pelas corinebactérias. Sem a identificação correta do organismo, é difícil determinar qual antibiótico administrar. O atraso no início do tratamento adequado pode levar o paciente à morte. Como as corinebactérias exibem suscetibilidade variável a muitos antimicrobianos, as opções de tratamento empírico ficam limitadas à vancomicina, que é universalmente ativa contra bastonetes Gram-positivos e à linezolida (CHUNG et al, 2008, MASUDA et al, 2017, NEEMUCHWALA et al, 2018).

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 *C. striatum*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium afermentans* e *Corynebacterium macginley* e variações geográficas na frequência de isolamento e na resistência natural e adquirida (BAIO et al, 2013, BELMARES et al, 2007, KNOX; HOLME, 2002, MARTINS et al, 2009, SEWELL et al, 1995).

1.2 *Corynebacterium striatum*

A espécie *C. striatum* é constituinte da microbiota normal da pele e de mucosas, no entanto, potencialmente patogênica em circunstâncias específicas, incluindo infecções de pacientes com doenças crônicas, com hospitalizações frequentes e prolongadas, expostos a antibióticos contra bactérias Gram-negativas (que facilita a seleção de bactérias Gram-positivas multirresistentes) e ao uso de procedimentos invasivos (FUNKE; BERNARD, 2011, GOMILA et al, 2012).

A transmissão hospitalar de *C. striatum* tem sido relatada com frequente aumento. Embora a sua importância e prevalência como agente causador de doenças não estejam bem estabelecidas, este micro-organismo tem sido responsável por uma variedade de quadros clínicos, como: feridas cirúrgicas, infecções do trato respiratório, nódulos pulmonares em paciente imunocomprometido e um raro caso de abscesso de tubo ovariano (MASUDA et al, 2017, SEVERO et al, 2014, YAMAMOTO et al, 2016). Infecções invasivas têm sido relatadas, como bacteremia, endocardites de válvula protética ou nativa, septicemia,

pneumonia, osteomielite, peritonite, artrite, meningite e um raro caso de mixoma atrial (ABI et al, 2013, BAIIO et al, 2013, BHAT et al, 2008, BOLTIN et al, 2009, CHEN et al, 2012, GOMILA et al, 2012, HONG; KOH; LEE, 2016, ISHIWADA et al, 2016, MARULL; CASARES, 2008, MASHAVI et al, 2006, MIZOGUCHI et al, 2014, OTSUKA et al, 2006, ROY; AHMAD, 2016, SAVINI et al, 2013, XU et al, 2017, YANAI et al, 2018).

Relatos de infecções relacionadas ao cateter, como endocardites e artrites, em pacientes imunocomprometidos, causadas por *C. striatum* e *C. jeikeium* tem ganhado importância, embora seja difícil distinguir entre uma possível contaminação de bacteremia, quando espécies de *Corynebacterium* ou estafilococos coagulase-negativo são isolados de hemoculturas. Porém, na clínica é importante distinguir contaminação de bacteremia para prevenir a prescrição desnecessária de antimicrobianos, que pode levar à seleção de micro-organismos resistentes, aumento do tempo da hospitalização e de custos (YANAI et al, 2018).

C. striatum tem sido relacionado a surtos epidêmicos hospitalares em diversos países, como Bélgica, Brasil, Itália, Espanha, Holanda, Japão e Tunísia. Em dois destes surtos, um nos Estados Unidos e outro na Holanda, a transmissão hospitalar de pessoa a pessoa proveniente de um único isolado foi evidenciada (ALIBI et al, 2017, BAIIO et al, 2013, BRANDENBURG et al, 1996, CAMPANILE et al, 2009, IARIA et al, 2007, ISHIWADA et al, 2016, LEONARD et al, 1994, OTSUKA et al, 2006, RENOM et al, 2007, SAVINI et al, 2013, VERROKEN et al, 2014).

São escassos os estudos realizados no Brasil, que investigam a presença de amostras de corinebactérias relacionadas com processos infecciosos em pacientes atendidos em instituições públicas e privadas. Em 2008, foram isoladas 163 estirpes de corinebactérias a partir de espécimes clínicos oriundos de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE/UERJ). A maioria das estirpes foi isolada do trato geniturinário e sítios intravenosos (46,6%), sendo que *C. striatum* correspondeu a apenas 4,9% do total de estirpes isoladas e nenhuma delas foi isolada de sítios intravenosos (CAMELLO et al, 2008). No ano seguinte, um surto por *C. striatum* multirresistente ocorrido no HUPE foi observado. A maioria das estirpes foram isoladas do trato respiratório e apenas duas de sítios intravenosos. No referido estudo, a relação epidemiológica das estirpes foi analisada usando a metodologia de *Pulsed field Gel Electrophoresis* (PFGE) e o pulstipo I foi o predominante, com sensibilidade apenas à tetraciclina, linezolid e vancomicina (BAIO et al, 2013). No mesmo hospital, durante o período de 2010 a 2013, 56 estirpes de corinebactérias foram isoladas de sítios intravenosos de pacientes fazendo ou não o uso de dispositivos invasivos, sendo *C. striatum* a espécie

predominante, correspondendo a 44,68% dos isolados. O pulsotipo I foi o mais frequentemente observado, com sensibilidade apenas à tetraciclina, vancomicina e linezolida (RAMOS, 2014).

O uso de dispositivos invasivos e a exposição aos antimicrobianos podem facilitar a disseminação sistêmica de *C. striatum*. Amostras 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 (CAZANAVE et al, 2012, FUNKE; BERNARD, 2011, ROY; AHMAD, 2016, VON GRAEVENITZ et al, 1998, WONG et al, 2010). *C. striatum* tem apresentado resistência intrínseca à maioria dos antimicrobianos recomendados ao tratamento de infecções por corineformes. 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 imunocomprometidos. 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).

1.3 A resistência aos antimicrobianos em corinebactérias

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 *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 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 têm 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, SHI et al, 2013).

São considerados micro-organismos multirresistentes os que apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes de antimicrobianos (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 antimicrobianos 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 linhagens bacterianas multirresistentes, inclusive aos antimicrobianos recentemente comercializados, levando a consequências importantes, com efeitos diretos na problemática das Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS). Dados da OMS apontam que mais de 50% das prescrições de antimicrobianos no mundo são inadequadas. O problema, de amplitude mundial, evidencia-se com o aumento do número de casos de IRAS provocados por microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis para uso clínico (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010; ARAÚJO, 2012; WATKINS & BONOMO, 2016).

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos para *Corynebacterium* spp. ainda é raramente realizado em muitos laboratórios clínicos e a escolha errada do antimicrobiano pode favorecer a seleção de micro-organismos resistentes. O método de suscetibilidade por disco-difusão é amplamente utilizado em muitos laboratórios de microbiologia, no Brasil e em outros países. Porém, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) não estabelece pontos de corte para disco-difusão enquanto o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), baseado no documento *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), estabelece esses pontos avaliados pelo método de disco-difusão para alguns antimicrobianos, excluindo vários deles, como cefalosporinas, carbapenêmicos e lipopeptídeos. Assim muitos pesquisadores frequentemente aplicam os pontos de corte para estafilococos para avaliar os antimicrobianos excluídos (BAIO et al, 2013, BELTRÁN-ARROYAVE; DIAZ-DIAZ; LOAIZA-DIAZ, 2016, DAS et al, 2016, IWALOKUN et al, 2011, MCELVANIA TEKIPPE et al, 2014). A **Tabela 1** apresenta os agentes antimicrobianos com pontos de corte para corinebactérias contemplados nos documentos do CLSI e do BrCAST. Como dito anteriormente, o BrCAST traz pontos de corte para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e para os diâmetros dos halos (método de disco-difusão), mas apenas para alguns antimicrobianos. A comparação apresentada na **Tabela 1** é baseada nos documentos do BrCAST (2017) e CLSI M45-A2 (2010). A terceira edição do CLSI M45-A3 foi publicada em 2016 e incluiu alguns gêneros corineformes como *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium* e *Trueperella* na tabela de pontos de corte para corinebactérias, incluindo *C. diphtheriae*. Além disso, os critérios para penicilina foram revisados e os critérios para imipenem foram deletados.

Tabela 1 - Comparação entre os documentos do CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017) mostrando os agentes antimicrobianos contemplados em cada documento.

Classe antimicrobiana	Agentes antimicrobianos	CLSI (apenas CIM)	BrCAST (CIM e disco- difusão)
Penicilinas	Penicilina	X	X
	Cefepime	X	
Cefalosporinas	Cefotaxime	X	
	Ceftriaxone	X	
Carbapenêmicos	Imipenem	X	
	Meropenem	X	
Glicopeptídeos	Vancomicina	X	X
Lipopeptídeos	Daptomicina	X	
Aminoglicosídeos	Gentamicina	X	X
Macrolídeos	Eritromicina	X	
Quinolonas	Ciprofloxacino	X	X
	Moxifloxacino		X
Tetraciclina	Doxiciclina	X	
	Tetraciclina	X	X
Lincosamidas	Clindamicina	X	X
Inibidores da via do folato	Sulfametoxazol-trimetoprim	X	
Ansamicina	Rifampicina	X	X
Estreptograminas	Quinupristina-dalfopristina	X	
Oxazolidinona	Linezolida	X	X

CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute*; BrCAST = *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; CIM = concentração inibitória mínima. A letra X indica a presença de pontos de corte para o antimicrobiano contemplado pelo documento. O CLSI não traz pontos de corte para corinebactérias pelo método de disco-difusão. Os critérios para imipenem foram excluídos da terceira edição do documento do CLSI M45-A3 (2016).

Fonte: (adaptado de BrCAST, 2017, CLSI, 2010)

Alguns estudos têm mostrado um aumento na taxa de resistência aos antimicrobianos entre as espécies de *Corynebacterium*, como a resistência aos beta-lactâmicos, clindamicina, eritromicina, ciprofloxacino e gentamicina, 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 (ORTIZ-PEREZ et al, 2010, REDDY et al, 2012, YOON et al, 2011). Até o momento não há relatos de resistência à vancomicina em corinebactérias. Outros antimicrobianos, como a linezolida e a daptomicina têm sido considerados agentes ativos contra as corinebactérias e uma alternativa ao tratamento empírico com vancomicina (GHIDE et al, 2010, GÓMEZ-GARCÉS; ALOS; TAMAYO, 2007, LAPPÀ et al, 2012, NHAN et al, 2012, ROLSTON et al, 2013, 2014). Porém, um estudo recente mostrou a emergência da resistência à daptomicina em estirpes de *C. striatum* isoladas em casos de

bacteremia (MCELVANIA TEKIPPE et al, 2014). Alguns mecanismos de resistência aos antimicrobianos nas diferentes espécies do gênero *Corynebacterium* são descritos a seguir.

1.3.1 Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B

Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B (MLSB) são antibióticos utilizados no tratamento de diversas infecções bacterianas. Apresentam estruturas químicas diferentes com o mesmo mecanismo de ação, que consiste em inibir a síntese proteica ao ligar-se à subunidade ribossomal 23S na subunidade 50S ribossomal (SEDAGHAT et al, 2017).

Dentre os macrolídeos, podemos citar a eritromicina, produzida pelo actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea* e seus derivados semissintéticos, claritromicina e azitromicina, sendo este último macrolídeo, um dos mais prescritos no mundo, usado no tratamento de infecções respiratórias adquiridas, gonorreia e infecções causadas por membros da família Enterobacteriaceae multirresistentes (FALLAHPOUR et al, 2017, PAWLOWSKI et al, 2018).

A lincomicina e seu derivado semissintético clindamicina são exemplos de antibióticos pertencentes à classe das lincosamidas. São antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese proteica ligando-se à subunidade ribossomal 50S. No entanto, podem ser bactericidas, quando a concentração da droga é aumentada. A clindamicina é usualmente mais ativa que a lincomicina no tratamento de infecções bacterianas (SPIZEK; REZANKA, 2017).

A quinupristina é um exemplo de estreptogramina do grupo B usada em associação com a dalfopristina, uma estreptogramina do grupo A, em uma proporção de 30:70, que inibe a síntese proteica pela ligação à subunidade ribossomal 50S (HUSSAIN et al, 2016).

Em estafilococos e estreptococos, a resistência aos antimicrobianos MLSB é determinada por três mecanismos diferentes, tais como: modificação do sítio de ligação ao ribossomo associada com a metilação ou mutação; efluxo do antibiótico da célula e inativação enzimática do antibiótico. Nas corinebactérias, esta resistência está relacionada à presença do gene *erythromycin ribosome methylat ion (ermX)*, que codifica a enzima rRNA metilase, provocando uma dimetilação da adenina presente na subunidade 23S rRNA, levando a resistência simultânea ao MLSB (FERNÁNDEZ-NATAL et al, 2016, OLENDER, 2012, ORTIZ-PEREZ et al, 2010).

O gene *ermX* foi encontrado em diferentes locais nas corinebactérias, como nos cromossomos de *C. jeikeium* e *C. striatum* (OLENDER, 2012, ROSATO; LEE; NASH, 2001); no plasmídeo pNG2, em *C. diphtheriae* e no transposon Tn5432 em *C. striatum*,

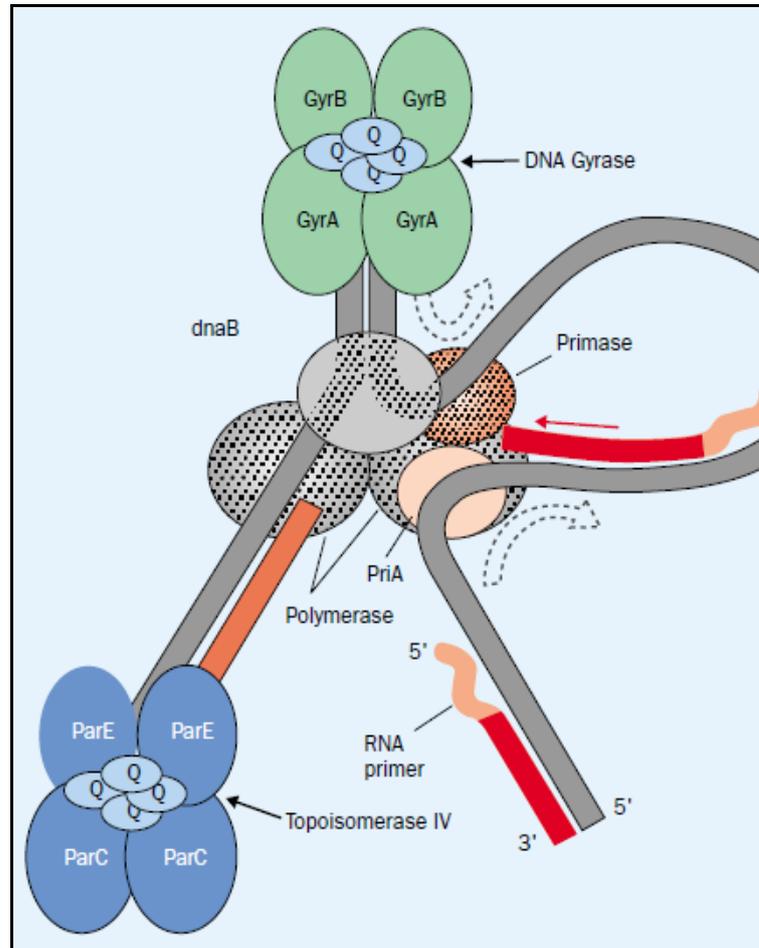
contido no plasmídeo pTP10 de aproximadamente 50 kb. Estas diferentes localizações do gene *ermX* em corinebactérias são provenientes de estirpes isoladas de várias regiões geográficas e pode indicar a possibilidade de aquisição de genes de resistência por estirpes multirresistentes de corinebactérias e de outras espécies que colonizam a pele ou mucosas (OLENDER et al, 2012, ROBERTS et al, 1992, TAUCH et al, 2000).

1.3.2 Resistência às quinolonas

As quinolonas são uma das classes de antimicrobianos mais descritas no mundo e são usadas para uma variedade de infecções bacterianas em humanos. A primeira quinolona isolada foi o ácido nalidíxico, a partir de um bioproduto da síntese da cloroquina. Foi então introduzido na clínica na década de 60 para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por bactérias entéricas. Na década de 80, novas quinolonas foram sintetizadas, como norfloxacino, ciprofloxacino e ofloxacino, com espectro de ação aumentado. Estas drogas tiveram o acréscimo de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico, por causa disso, as quinolonas são comumente chamadas de “fluoroquinolonas” (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014, HOOPER; JACOBY, 2015).

A resistência às quinolonas emergiu com o vasto uso clínico destes antimicrobianos sintéticos e tornou-se comum em alguns patógenos bacterianos. Dentre os mecanismos de resistência às quinolonas mais comumente descritos estão as alterações em genes cromossomais, como nas subunidades A e B da enzima girase (também conhecida como topoisomerase II) e nas subunidades *parC* e *parE*, da topoisomerase IV. As subunidades *parC* e *parE* da topoisomerase IV são homólogas às subunidades *gyrA* e *gyrB* da topoisomerase II (**Figura 1**). Em Gram-negativos, as mutações ocorrem geralmente no gene *gyrA* e em Gram-positivos no gene *parC*. Entretanto, o sequenciamento dos genomas de diversas espécies, tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* e *Treponema pallidum*, revelou a ausência dos genes para topoisomerase IV. Outros mecanismos de resistência às quinolonas, como bombas de efluxo e resistência mediada por plasmídeos também são descritos (GUAN et al, 2013, HOOPER; JACOBY, 2015, SIERRA et al, 2005).

Figura 1 – Ilustração das topoisomerases II (DNA Girase) e IV e suas respectivas subunidades.



Fonte: (Hooper, 2002).

Após a administração das fluoroquinolonas, uma pressão seletiva é criada nos órgãos do corpo onde as fluoroquinolonas tendem a se acumular. A exposição a estes antimicrobianos seleciona mutantes em grandes populações bacterianas, incluindo àquelas que colonizam a pele e as membranas mucosas, como as corinebactérias. Assim, a resistência às fluoroquinolonas emergiu em estirpes clínicas de *C. striatum* e *C. amycolatum* (ALIBI et al, 2017, SIERRA et al, 2005).

Estudos das sequências da região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) do gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima girase (GyrA), em estirpes de *C. striatum*, *C. amycolatum* e *C. macginley*, mostraram que a resistência às fluoroquinolonas está associada com mutações de natureza espontânea na região QRDR e depende do número de mutações e o tipo de aminoácido que foi substituído. O nível de resistência resultante depende

do tipo de aminoácido que foi substituído pelo aminoácido pré-existente. Alguns tipos de mutações diminuem a sensibilidade das fluoroquinolonas, outras reduzem potencialmente a afinidade e a atividade das fluoroquinolonas (EGUCHI et al, 2008, SIERRA et al, 2005).

Em estirpes clínicas de *C. striatum*, substituições de aminoácidos no códon 87 da proteína GyrA geraram resistência ao ciprofloxacino, mas duplas mutações no gene *gyrA* (códon 87 e 91) foram necessárias para altos níveis de resistência ao ciprofloxacino e ao moxifloxacino (ALIBI et al, 2017, SIERRA et al, 2005). Em estirpes clínicas de *C. amycolatum*, duplas mutações (códon 87 e 88) na proteína GyrA levaram a altos níveis de resistência às fluoroquinolonas, mas mutações duplas nos códon 87 e 91, como em *C. striatum* também podem ocorrer e levam também a altos níveis de resistência às fluoroquinolonas (SIERRA et al, 2005). Posteriormente, um caso de bacteremia por *C. amycolatum* contendo novas mutações nos códon 87 e 91 da enzima GyrA foi relatado por Yoon et al (2011), quando a estirpe apresentou altos níveis de resistência ao ciprofloxacino (CIM >32 mg/L).

Em estirpes clínicas de origem oftálmológica de *C. macginley*, uma única mutação no aminoácido no códon 83 na região QRDR resultou na resistência à norfloxacina. Já uma dupla mutação nos códon 83 e 87 (equivalentes aos códon 87 e 91 em *C. striatum* e *C. amycolatum*) levou a resistência a todas as fluoroquinolonas (EGUCHI et al, 2008).

1.3.3 Resistência às tetraciclinas

A classe das tetraciclinas representa um grande e diverso grupo de compostos, variando das naturalmente produzidas clortetraciclina e oxytetraciclina, como produtos do metabolismo secundário do actinomiceto *Streptomyces aureofaciens* aos derivados semissintéticos da segunda e terceira gerações, como a doxiciclina e minociclina, respectivamente, e mais recentemente a tigeciclina do grupo das glicilciclinas. A tigeciclina, derivada da minociclina, é um produto análogo à tetraciclina, ativo contra inúmeras bactérias resistentes às tetraciclinas e a outras classes de antibióticos (NGUYEN et al, 2014, PEREIRA-MAIA et al, 2010, THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010).

A resistência às tetraciclinas ocorre devido a vários mecanismos, entretanto os que predominam atualmente em contextos clínicos são o efluxo ativo de tetraciclinas da célula e a produção de proteínas de proteção ribossômica. As proteínas de efluxo de tetraciclinas pertencem à superfamília de proteínas de efluxo denominadas *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que exportam a tetraciclina da célula, reduzindo a concentração da droga intracelular e

assim protegendo o ribossomo, um dos maiores alvos das tetraciclinas. A expressão das proteínas da MFS é regulada pelo repressor TetR, o qual se liga ao opressor do operador de genes codificadores de bombas de efluxo e regula a expressão da proteína (NGUYEN et al, 2014, THAKER; SPANOIANNPOULOS, WRIGHT, 2010).

A resistência às tetraciclinas em corinebactérias é devida principalmente à expressão dos pares de genes *tetA-tetB* (OLENDER, 2013), que atuam como bomba de efluxo desses antimicrobianos, inicialmente identificados no plasmídeo pTP10 de *C. striatum* M82B, tendo a sequência de inserção (IS) IS1249 adjacente ao gene *tetA* e um quadro de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) incompleto, nomeado ORF3, adjacente ao gene *tetB*, importantes para a expressão dos genes *tetAB*. Esta região de resistência à tetraciclina foi sequenciada e clonada, apresentou conteúdo GC de 68%, significativamente mais elevado que o conteúdo GC do genoma de *C. striatum* (média de 57,6%), podendo indicar que esta região foi transferida horizontalmente para *C. striatum*, de um micro-organismo com um alto conteúdo GC. Os genes *tetAB* também foram encontrados no transposon Tn3598 contido no genoma de *C. jeikeium* K411 (TAUCH et al, 2000, 2005) e no cromossomo da cepa tipo de *C. urealyticum* DSM7109 (SALEM et al, 2005).

As proteínas TetAB representam um grupo específico de determinantes de resistência à tetraciclina, que utilizam o ATP como fonte de energia, ao invés do gradiente de próton (SALEM et al, 2015). Em corinebactérias, os genes *tetAB* conferem resistência a tetraciclina, oxitetraciclina e em menor nível, a outros derivados, como clortetraciclina, minociclina e doxiciclina. A bomba de efluxo resultante da expressão desses genes conferiu também resistência ao beta-lactâmico oxacilina em algumas corinebactérias (SALEM et al, 2015, TAUCH et al, 1999).

As proteínas de proteção ribossômica (*ribosomal protection proteins* - RPP) são codificadas por uma classe de genes encontrada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo os genes *tetM* e *tetO* os mais estudados. As RPP reduzem a suscetibilidade dos ribossomos às ações das tetraciclinas (THAKER; SPANOIANNPOULOS, WRIGHT, 2010). O gene *tetM*, responsável pela resistência a todas as tetraciclinas (ROBERTS et al, 1992), foi encontrado em 97% das estirpes de *C. striatum* estudadas por Martinez-Martinez et al (1995). O gene *tetW* encontrado no plasmídeo de *Corynebacterium resistens* DSM 45100, isolado de sangue de paciente com leucemia, foi clonado em *Corynebacterium glutamicum* e conferiu altos níveis de resistência à tetraciclina, à doxiciclina e à minociclina. A proteína TetW de *C. glutamicum* apresentou elevada identidade (99%) com a proteína TetW de

Lactobacillus reuterii ATCC 55730, cepa probiótica comercialmente disponível (SCHRODER et al, 2012).

1.3.4 Resistência aos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são agentes antibacterianos que inibem a síntese da parede celular bacteriana, como resultado da sua forte ligação covalente às proteínas de ligação às penicilinas (*penicillin-binding proteins* - PBP), que catalisam a última reação da formação de paredes celulares em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os beta-lactâmicos inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptideoglicana da parede celular bacteriana, por meio da formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptideoglicana. Essas ligações, que conferem à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio. Estes antimicrobianos possuem em comum um anel beta lactâmico no seu núcleo estrutural. Pertencem ao grupo dos antimicrobianos beta-lactâmicos as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos (AMINOV, 2016, BUSH, 2017, GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010, NIKAIDO, 2009).

O uso terapêutico dos beta-lactâmicos começou com a introdução da benzilpenicilina (penicilina G) durante a Segunda Guerra Mundial e continuou com o desenvolvimento de novas cefalosporinas e carbapenêmicos. A maior incidência de resistência aos beta-lactâmicos é devido à presença de enzimas beta-lactamases, que inativam os antibióticos beta-lactâmicos, sendo codificadas por genes frequentemente localizados em plasmídeos ou transposons. Algumas enzimas beta-lactamases são cromossomais e provocam resistência intrínseca aos antibióticos beta-lactâmicos (ALEKSHUN; LEVY, 2007, BUSH, 2017). As enzimas beta-lactamases são classificadas em 4 classes de moléculas, A, B, C e D, baseadas nas sequências dos aminoácidos e seus motivos conservados. Os grupos funcionais 1, 2 e 3 são usados para atribuir uma descrição útil clinicamente, com subgrupos designados de acordo com os perfis de substrato e inibidores (BUSH, 2013).

São escassos os estudos sobre a resistência aos beta-lactâmicos em corinebactérias. Esta pode estar relacionada tanto com a produção de beta-lactamases como com a modificação nas PBP, conforme estudos fenotípicos e genotípicos em algumas espécies, tais como *C. striatum*, *C. jeikeium* e *C. urealyticum* (OLENDER, 2012). Em estudos realizados num hospital da Tunísia, a resistência à penicilina nas estirpes de *C. striatum* foi associada à

presença do gene *bla*, codificando uma serina hidrolase pertencente à classe A das beta-lactamases. Já a resistência ao antimicrobiano cefotaxime foi associada à presença do gene *ampC*, codificando uma enzima da classe C das beta-lactamases (ALIBI et al, 2017).

A resistência aos beta-lactâmicos em *C. resistens* DSM 45100 pode estar associada com a presença de PBP, pertencentes à três famílias de proteínas, sendo PBP1a e PBP1b bifuncionais (*transglycosilases/transpeptidases*), de alto peso molecular. Além das seis PBP encontradas, dois genes *ldt1* e *ldt2*, que codificam as enzimas putativas L,D-transpeptidases, que podem atuar como uma via alternativa para a resistência aos beta-lactâmicos, inibindo as PBP (SCHRODER et al, 2012). A análise do genoma de *C. glutamicum* mostrou a presença de quatro genes codificadores das proteínas PBP de alto peso molecular, como PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b, dois genes codificadores de PBP4 e PBP4b (baixo peso molecular) e dois genes que provavelmente codificam beta-lactamases (OTSUKA et al, 2005, 2006, VALBUENA et al, 2007).

1.3.5 Resistência ao cloranfenicol

O cloranfenicol é um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces venezuelae*, isolada pela primeira vez em 1947 em uma amostra de solo coletada na Venezuela. Atualmente é sintetizado, sendo um potente inibidor das proteínas microbianas, cujo mecanismo de ação consiste em ligar-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano. Uma vez que o cloranfenicol se liga à mesma região que os macrolídeos e as lincosamidas, eles não podem ser administrados em associação. É um antimicrobiano de espectro relativamente amplo, predominantemente bacteriostático, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, riquetsias, clamídias e micoplasmas (DEL FIOLE; AVALLONE, 2005, GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010, SCHWARZ et al, 2016).

Em corinebactérias, a resistência ao cloranfenicol está ligada com a presença do gene *cmx*, responsável por codificar a proteína de efluxo do cloranfenicol, pertencente à MFS, que inibe a passagem do antibiótico para dentro do citoplasma (OLENDER, 2012).

O gene *cmx* foi encontrado no plasmídeo de *C. striatum* M82B, flanqueado pelo transposon Tn5564 (TAUCH et al, 1998) e também no plasmídeo de *C. resistens* DSM 45100, flanqueado pelo transposon Tn45, um elemento genético móvel incomum em corinebactérias, constituído pelos genes da transposase e *cmx* (SCHRODER et al, 2012). Em *Corynebacterium imitans* DSM 44264, o gene *cmx* foi encontrado no cromossomo (MOLLMANN et al, 2014).

1.3.6 Resistência aos aminoglicosídeos

O primeiro aminoglicosídeo, estreptomicina, foi obtido a partir do actinomiceto *Streptomyces griseus*, em 1943. Posteriormente, outros aminoglicosídeos derivados dos actinomicetos e seus variantes semissintéticos foram desenvolvidos. Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ligando-se à subunidade 30S ribossomal e constituem a segunda linha de tratamento, ou seja, antimicrobianos complementares usados para o tratamento de infecções causadas por corinebactérias (NAVAS et al, 2016, TAKAHASHI; NAKASHIMA, 2018, SHI et al, 2013).

Alguns mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos podem ocorrer, como alteração dos sítios de ligação no ribossomo por mutações ou por mutações enzimáticas pelas metiltransferases; alteração na permeabilidade da membrana e modificação enzimática da droga. Embora poucos sistemas bacterianos de efluxo sejam capazes de remover os aminoglicosídeos das células, devido à natureza policatiônica da droga, esse é o mecanismo de resistência mais comum em *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes com fibrose cística. Em *M. tuberculosis*, a resistência aos aminoglicosídeos mais frequente é devido a mutações que ocorrem no gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12 ou no gene *rrs*, que codifica o gene ribossomal 16S rRNA (POOLE, 2005, 2011, SHI et al, 2013). Mutações na posição 1401 no gene 16S rRNA (substituição de adenina para guanina) leva à resistência aos aminoglicosídeos amicacina e kanamicina (JNAWALI et al, 2013, SUZUKI et al, 1998). Mutações entre a região 530 a 915 no operon ribossomal 16S leva a resistência à estreptomicina (SHI et al, 2013, WU et al, 2006)

A modificação enzimática por enzimas modificantes dos aminoglicosídeos é o mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos. Três classes de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos são conhecidas: *acyl-coenzyme A-dependent acetyltransferase* (AAC), *nucleoside triphosphate-dependent nucleotidyltransferase* (ANT) e *nucleoside triphosphate-dependent phosphotransferase* (APH). Estas enzimas são frequentemente disseminadas por vários elementos genéticos móveis. Muitos aminoglicosídeos podem ser inativados por mais de uma enzima, algumas destas podem atuar como substratos para os aminoglicosídeos (SHI et al, 2013). Em 2015, uma nova AAC foi descrita em *C. striatum*, AAC(3)-XI. O gene foi clonado em *Escherichia coli* e conferiu resistência aos aminoglicosídeos pela acetilação (GALIMAND et al, 2015).

Em corinebactérias, a modificação enzimática por inativação é o mecanismo mais prevalente de resistência aos aminoglicosídeos. A enzima aminoglicosídeo O-fosfotransferase é codificada por genes encontrados em plasmídeos e transposons em diversas espécies de corinebactérias. Os genes que codificam as enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos foram descritos no plasmídeo pJA144188 de *C. resistens* e no integron localizado neste plasmídeo (SCHRODER et al, 2012); no transposon Tn5715 contendo uma região de resistência aos aminoglicosídeos, descrito no plasmídeo pXZ10145 de *C. glutamicum* (SHEN et al, 1993) e no cromossomo da cepa tipo de *C. urealyticum* DSM 7109 (TAUCH et al, 2008), dentre outros. O principal mecanismo de resistência à estreptomicina em corinebactérias está relacionado à presença dos pares de genes *strA-strB*, que codificam as enzimas *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*, respectivamente (NAVAS et al, 2016).

1.3.7 Resistência à daptomicina

A daptomicina é um lipopeptídeo natural, que exibe potente atividade bactericida *in vitro* contra muitos patógenos Gram-positivos, incluindo micro-organismos multirresistentes. Seu mecanismo de ação consiste em despolarizar a membrana celular, inibindo a síntese de proteínas, DNA e RNA, levando à morte celular (SADER et al, 2013, TAYLOR; PALMER, 2016, TRAN et al, 2012).

Os mecanismos de resistência à daptomicina são complexos e multifatoriais. Em *Staphylococcus aureus*, a resistência tem sido atribuída a polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes *mprF*, *ycyG*, *ycyH*, *ropB* e *ropC*, genes envolvidos na síntese da membrana celular e translocação da proteína através da membrana celular. Em enterococos, a resistência está ligada às mutações nos genes *liaF*, *ycyG* e *gdpD*, que regulam a homeostase da membrana celular, metabolismo de fosfolípido da membrana celular e resposta ao estresse bacteriano. No entanto, homólogos destes genes associados com a resistência à daptomicina em *S. aureus* e enterococos não foram identificados em corinebactérias (MCELVANIA TEKIPPE et al, 2014, SCHOEN et al, 2009). Estudos recentes em *C. striatum* resistente à daptomicina mostraram que mutações no gene *pgsA*, que codifica a enzima fosfatidilglicerolfosfato sintase, estão envolvidas no mecanismo de resistência à daptomicina, comum também em *S. aureus* resistente à daptomicina (HINES et al, 2017).

O primeiro caso de resistência à daptomicina em corinebactérias foi relatado em 2009, na qual *C. jeikeium* foi recuperado da corrente sanguínea de um paciente com neutropenia

aguda, após tratamento com daptomicina para bacteremia por *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus haemolyticus* susceptíveis à vancomicina (SCHOEN et al, 2009).

Um caso de endocardite de válvula nativa por *C. striatum* foi descrito, no qual o isolado apresentou heterorresistência à daptomicina, com duas subpopulações mostrando suscetibilidade (CIM <0.094 µg/ml) e alto nível de resistência à daptomicina (CIM >256 µg/ml). Inicialmente, o paciente teve bacteremia e osteomielite por *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) e foi tratado por longo período com daptomicina. Foi evidenciado que, a partir do ensaio de citocromo *c* modificado, a membrana celular do isolado suscetível de *C. striatum* foi despolarizada pela daptomicina em concentrações dependentes acima de 2 µg/ml, como ocorre em alguns fenótipos resistentes de *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*, com mudanças na carga da superfície celular e alterações na habilidade da daptomicina para despolarizar a membrana celular. Já no isolado resistente de *C. striatum*, a despolarização da membrana pela daptomicina não ocorreu (em concentrações de até 32 µg/ml). A despolarização da membrana não estava associada com mudanças na carga da superfície celular como determinado pelo ensaio de citocromo *c*, que não mostrou diferenças significativas entre a quantidade de citocromo *c* não-ligado nas estirpes suscetíveis e resistentes (TRAN et al, 2012). Outros casos de heterorresistência à daptomicina em *C. striatum* também já foram relatados (MCELVANIA TEKIPPE et al, 2014, WERTH et al, 2016). Nos estudos realizados por Werth et al (2016), uma das estirpes resistentes de *C. striatum* reverteu ao fenótipo sensível após o cultivo em meio livre de daptomicina, com concomitante aumento na ligação da daptomicina à membrana, diferindo dos resultados anteriormente relatados por McElvania TeKippe et al (2014), em que as estirpes mantiveram os fenótipos resistentes após múltiplos subcultivos na ausência de daptomicina, podendo sugerir que a resistência à daptomicina em *C. striatum* nem sempre surge por mecanismos homogêneos.

1.3.8 Resistência aos antimicrobianos rifampicina e cotrimoxazol

Até o momento, os mecanismos de resistência aos antimicrobianos rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprim (cotrimoxazol) em corinebactérias não foram descritos, apesar da resistência a esses antimicrobianos em outras espécies filogeneticamente relacionadas ter sido relatada (BAIO et al, 2013, MINA et al, 2011, OLENDER, 2013).

A rifampicina bloqueia a transcrição bacteriana, inibindo a enzima RNA polimerase. É utilizada clinicamente como parte da combinação de fármacos para o tratamento de tuberculose. Devido à uma boa atividade sinérgica, a rifampicina tem sido utilizada em combinação com a daptomicina no tratamento de infecções por *C. striatum* e *C. amycolatum*, incluindo endocardites e também em combinação com vancomicina para tratamento de pneumonia por *C. striatum* (ALIBI et al, 2017, DALAL; URBAN; SEGAL-MAURER, 2008, SHAH; MURILLO, 2005, TARR et al, 2003). A rifampicina é comumente usada no tratamento de infecções por *C. pseudotuberculosis* em cavalos, por ser altamente lipofílica e ter boa penetração intracelular (RHODES et al, 2015).

Em *Mycobacterium*, gênero relacionado às corinebactérias, a resistência à rifampicina está relacionada a mutações no gene constitutivo *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase. Em 95% dos casos, a resistência à rifampicina em *M. tuberculosis* é causada por mutações dentro dos 81 pb da região determinante de resistência à rifampicina (*rifampin resistance-determining region* – RRDR), correspondendo aos códons 507-533. Mas em estirpes não-clínicas de *Nocardia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* spp. e outras espécies de *Mycobacterium*, a resistência à rifampicina não é comumente por mutações no gene *rpoB* (AHMAD; MOKADDAS; FARES, 2002, DANTAS et al, 2015). Diversos outros mecanismos de resistência à rifampicina têm sido identificados, incluindo mutação em gene que codifica proteínas envolvidas no efluxo de rifampicina em *Pseudomonas fluorescens*; inativação da rifampicina por decomposição, glicosilação, fosforilação e ribosilação, também têm sido relatados. A inativação da rifampicina por ribosilação foi pesquisado em *Corynebacterium* spp. em paralelo com espécies de *Nocardia*, mas não foi observada (CHANDRASEKARAN; LALITHAKUMARI, 1998, DABBS et al, 1995, TANAKA et al, 1996, TRIBUDDHARAT; FENNEWALD, 1999).

Os antibióticos sulfonamidas e trimetoprim são inibidores de 3 famílias de enzimas, nas quais duas são enzimas-chave na via do folato em bactérias e eucariotos primitivos, que são: dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), codificadas pelos genes *folP* e *folA*, respectivamente (CAPASSO; SUPURAN, 2014, WILEN et al, 2009, YUN et al, 2012). Não há nenhum equivalente de DHPS em humanos, fazendo com que esta seja um alvo ideal para drogas antimicrobianas (LEVY; MINNIS; DERRICK, 2008, VALDERAS et al, 2008).

O sulfametoxazol é uma sulfonamida que inibe a enzima DHPS, que catalisa a formação do dihidrofolato do ácido para-aminobenzóico (PABA). Na fase subsequente desta via, o trimetoprim inibe a enzima DHFR, que catalisa a formação do tetraidrofolato do

dihidrofolato, essencial na síntese do DNA bacteriano. Essa etapa causa bloqueio sequencial na síntese do ácido fólico bacteriano. O trimetoprim é um antimicrobiano sintético pertencente ao grupo de compostos diaminopirimidina, que inibe a atividade da enzima. A associação do trimetoprim com o sulfametoxazol é sinérgica e exibe atividade contra uma variedade de patógenos, incluindo bactérias, fungos e parasitas (KAYE; GALES; DUBOURG, 2017, KORSAK; KRAWCZYK-BALSKA, 2017).

Em bactérias Gram-positivas, a resistência às sulfonamidas tem mostrado ser devido a mutações cromossômicas no gene *folP*, como em *Streptococcus* spp., *Bacillus anthracis*, *Neisseria meningitidis*, entre outras espécies, mas podendo ocorrer também em bactérias Gram-negativas, como *Campylobacter jejuni* e *Helicobacter pylori*. Em bactérias Gram-negativas, a resistência às sulfonamidas é comumente adquirida, seja por plasmídeos ou integrons, contendo genes variantes que codificam a enzima DHPS, dentre eles o *sul1*, *sul2* ou *sul3* (BUWEMBO et al, 2013, FIEBELKORN; CRAWFORD; JORGENSEN, 2005, GIBREEL; SKOLD, 1999, VALDERAS et al, 2008, WU et al, 2010).

A resistência ao trimetoprim pode ocorrer por alteração da permeabilidade celular, duplicação gênica, mutações espontâneas no gene *folA* ou aquisição de genes *dfr*, que codificam enzimas DHFR resistentes, entre outros. Em *Listeria monocytogenes*, a substituição de apenas um aminoácido na enzima DHFR é responsável pelo fenótipo resistente ao trimetoprim (CAPASSO; SUPURAN, 2014, KORSAK; KRAWCZYK-BALSKA, 2017, WILEN et al, 2009, YUN et al, 2012).

1.4 Mobiloma

O mobiloma é definido como elementos genéticos capazes de mover-se livremente dentre e entre os genomas. Esses elementos podem ser transposons, sequências de inserção, plasmídeos, fagos, ilhas genômicas, elementos conjugativos integrativos (ICE) e os genes que estes carregam (LEPLAE; LIMA-MENDEZ; TOUSSAINT, 2010). Alguns desses elementos do mobiloma foram descritos em corinebactérias e estão envolvidos na transmissão de genes de resistência, tanto em espécies patogênicas e não-patogênicas (ADDERSON et al, 2008, FERNANDEZ-ROBLAS et al, 2009, OLENDER et al, 2012).

Os genes de resistência aos antimicrobianos encontrados nas diversas espécies de *Corynebacterium* estão frequentemente localizados em grandes plasmídeos, mas também

associados a transposons, integrons e sequências de inserção (BARRAUD et al, 2011, DALAL; URBAN; SEGAL-MAURER, 2008, DEB; NATH, 1999, SCHRODER et al, 2012).

1.4.1 Integrons

Integrons são elementos genéticos que foram descobertos no final dos anos 80 e são compostos de um gene que codifica uma enzima integrase, cassetes de genes e um sítio de integração para estes cassetes de genes. Embora a maioria dos integrons tenha sido descrita inicialmente em estirpes clínicas humanas, esses elementos também já foram identificados em muitas bactérias ambientais, como de água e de solo (AN et al, 2018, DI et al, 2018, FLUIT; SCHMITZ, 1999, GILLINGS, 2014).

Os integrons são elementos genéticos versáteis, caracterizados pela capacidade de inserir, excisar, rearranjar e expressar genes através de um sistema de recombinação sítio-específico. São considerados elementos móveis quando associados a transposons e/ou plasmídeos conjugativos. Eles podem atuar como veículos da transmissão intra e inter-específica de material genético, podendo ser encontrados também no cromossomo bacteriano. O primeiro integron cromossomal descrito foi em *Vibrio cholerae* e contemplava uma centena de cassetes gênicos, que codificavam proteínas de funções desconhecidas. Os integrons estão presentes em aproximadamente 10% dos genomas bacterianos sequenciados (DOMINGUES; SILVA; NIELSEN, 2012, GILLINGS, 2014, ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2001).

Os integrons são caracterizados em classes com base no tipo de gene da integrase neles presentes. Mais de 20 integrases diferentes já foram identificadas. As classes 1, 2 e 3 de integrons são as mais comumente encontradas. O integron de classe 1 é o mais frequentemente observado em amostras clínicas (FLUIT; SCHMITZ, 1999, 2004, STOKES; HALL, 1989).

Os cassetes gênicos presentes nos integrons podem ser capturados, excisados do mesmo e novamente inseridos em outro integron (COLLIS et al, 2002). Um sítio de recombinação *attC* na extremidade 3' da região codificante dos cassetes gênicos é capaz de ser reconhecido pela integrase e, através de uma recombinação sítio-específico, o cassete é mobilizado e inserido no integron, caracterizando-o como um elemento móvel (COLLIS et al, 1993, COLLIS; HALL, 1992). Os cassetes gênicos podem estar vazios ou com genes que conferem resistência aos antibióticos e desinfetantes, sendo que os genes de resistência aos

antibióticos são as estruturas mais frequentemente encontradas (FLUIT; SCHMITZ, 1999, 2004).

Há poucos estudos sobre a presença de integrons em bactérias Gram-positivas, especialmente em corinebactérias, salva exceção de *C. glutamicum*, corinebactéria muito utilizada em estudos genéticos e processos biotecnológicos em escala industrial, cuja expressão dos genes localizados em cassetes no integron mostrou-se mais elevada quando comparada com a expressão em *Escherichia coli* (FLUIT; SCHMITZ, 1999, NESVERA; HOCHMANNOVA; PATEK, 1998). Em 1998, um integron de classe 1 foi primeiramente observado em *C. glutamicum* localizado no plasmídeo pCG4 de 29 kb, com sequência quase idêntica ao integron InC encontrado no plasmídeo pSA1700 de *Pseudomonas aeruginosa*. Em 2002, um integron de classe 1 contendo um gene de integrase truncado pela sequência de inserção *IS6100* e genes de resistência à estreptomicina, à espectinomicina e à tetraciclina foi encontrado no plasmídeo pTET3 de 27,8 kb da estirpe *C. glutamicum* LP-6 (LI et al, 2017).

Em 2004, na pesquisa conduzida em fazendas nos Estados Unidos houve uma detecção de 100% de integrons de classe 1 em corinebactérias, como *Corynebacterium ammoniagenes* e *Corynebacterium casei*, carreando múltiplos cassetes de genes de resistência. A pesquisa também foi conduzida em outras bactérias Gram-positivas, mostrando que estas podem servir como reservatórios de integrons de classe 1 carreando vários genes de resistência aos antibióticos (NANDI et al, 2004).

Em 2011, estudos realizados na França mostraram a presença de integron de classe 1 em *C. diphtheriae* subtipo *mitis*, e este abrigava dois cassetes de genes de resistência, sendo que o cassete *dfrA16*, de 588 pb conferia resistência ao trimetoprim e o outro cassete *quacH*, de 511 pb, conferia resistência aos compostos quaternários de amônio (BARRAUD et al, 2011).

A presença de integron de classe 1 também foi encontrado no plasmídeo pJA144188, de *C. resistens*. Neste estudo estavam associados ao integron os seguintes genes que conferem resistência aos antimicrobianos: *sulI*, a um amplo espectro de sulfonamidas; *aadA1a*, aos aminoglicosídeos estreptomicina e espectinomicina; *aacAI*, aos aminoglicosídeos kanamicina, tobramicina, netilmicina e outros; *qacEΔ1*, aos desinfetantes e compostos quaternários de amônia (SCHRODER et al, 2012).

1.4.2 Elementos de transposição

As sequências de inserção (SI) são os tipos mais simples existentes de elementos de transposição (transposons), tipicamente pequenas (menores que 2 kb), sendo encontradas em plasmídeos e cromossomos de várias espécies bacterianas. O termo transposon refere-se a um conjunto de segmentos lineares de DNA que são capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente de homologia entre a região genômica onde encontram-se inseridos e o local ao qual se destinam (ADAMS; BISHOP; WRIGHT, 2016; MAHILLON; CHANDLER, 1998, SOARES et al, 2012, TSUGE et al, 2005).

As SI são compostas de repetições terminais invertidas, com aproximadamente 20 pb, presentes em pontas opostas e de genes para codificação da transposase, uma nuclease altamente específica. Cada SI leva seu próprio promotor para transcrição de seu gene de transposase. As SI podem causar deleções, inversões e duplicações de genes (MAHILLON; CHANDLER, 1998, TSUGE et al, 2005). As SI são classificadas em diversas famílias, baseadas na homologia da sequência do aminoácido da transposase, sequências das repetições terminais invertidas e no tamanho do sítio de sequência-alvo (MAHILLON; CHANDLER, 1998).

No plasmídeo pTP10 do isolado clínico de *C. striatum* M82B, foram encontrados genes que conferem resistência aos antibióticos cloranfenicol, eritromicina, kanamicina e tetraciclina. As análises da sequência do gene de resistência ao cloranfenicol (*cmx*) revelaram que este encontrava-se inserido no transposon Tn5564 e o mesmo era flanqueado por uma IS1513 (de 1715 pb) que codifica uma transposase da família IS30. Na região central do transposon Tn5564 há uma ORF homóloga à transposase de IS identificadas em *Paenarthrobacter nicotinovorans* (anteriormente conhecido como *Arthrobacter nicotinovorans*) e *Bordetella pertussis* (TAUCH et al, 1998).

No plasmídeo pTET3 de *C. glutamicum*, cada região com genes de resistência aos antimicrobianos é flanqueada pela IS6100, inicialmente identificada em *Mycobacterium fortuitum* (TAUCH, A. et al, 2002). O sequenciamento do integron de *C. diphtheriae mitis* mostrou que este era flanqueado pela mesma IS6100 encontrada em *C. glutamicum* (BARRAUD et al, 2011). No plasmídeo pJA144188 de *C. resistens* há presença de várias SI, sendo que a IS6100 flanqueia a extremidade 5' do integron de classe I encontrado neste plasmídeo (SCHRODER et al, 2012).

1.4.3 Plasmídeos

Plasmídeos são definidos como elementos genéticos extra-cromossomais, formados por DNA fita dupla, que contém elementos necessários para sua replicação. A maioria dos plasmídeos conferem fenótipos que podem ser selecionados pela presença de genes de resistência. Variam em tamanho e pode ter mais de uma cópia por célula (CARATTOLI, 2014). O maior plasmídeo descrito em corinebactérias tem cerca de 85.000 pb, encontrado na cepa tipo de *Corynebacterium callunae* DSM 20147, uma bactéria ambiental alcalino-tolerante, que cresce bem na faixa de pH 5.0-9.0, de importância industrial, produtora de ácido L-glutâmico (PERSICKE et al, 2015). Um dos menores plasmídeos descritos em corinebactérias foi encontrado no patógeno humano *C. diphtheriae*, isolado não toxigênico da garganta de uma criança de 9 anos, com apenas 1.960 pb e quatro sequências codificantes, com similaridade parcial (67%) com o plasmídeo pTA144 de *Moraxella* sp. e metamobiloma de um micro-organismo não-cultivável (ANTUNES et al, 2017).

Diversos genes relacionados à resistência aos antibióticos, incluindo uma região de resistência à tetraciclina foram encontrados no plasmídeo pJA144188 de *C. resistens* DSM 45100, com cerca de 28.000 pb. Essa região de resistência à tetraciclina abriga o gene *tetW*, que foi clonado em *C. glutamicum* e mostrou conferir altos níveis de resistência à tetraciclina, à doxiciclina e à minociclina. Esta região apresentou alta similaridade com as regiões de resistência à tetraciclina encontradas em *Lactobacillus reuteri* e *Streptococcus suis* (SCHRODER et al, 2012).

Em um isolado clínico de *C. striatum* M82B, o plasmídeo pTP10 de 51.409 pb, carrega 16 genes determinantes de resistência, dividido em segmentos. Dois segmentos são altamente similares às regiões encontradas em outras corinebactérias, como a região de resistência ao cloranfenicol da bactéria ambiental *C. glutamicum* e a região de resistência à eritromicina do patógeno humano *C. diphtheriae*. Outros 3 segmentos foram altamente similares às regiões encontradas em espécies distintas, como a região do DNA cromossomal de *Mycobacterium tuberculosis*; transposons de espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Erwinia* e a região de resistência aos aminoglicosídeos do patógeno de peixe *Pausterella piscicida* (TAUCH et al, 2000).

1.4.4 Ilhas genômicas

As ilhas genômicas são elementos genéticos móveis presentes nos genomas bacterianos, que podem abrigar genes que codificam virulência, resistência a antibióticos, patogenicidade, simbiose ou metabolismo, tornando as bactérias organismos altamente

diversificados, capazes de se adaptar a vários ambientes e hospedeiros devido à sua alta plasticidade genômica. As ilhas genômicas são adquiridas por transferência horizontal de genes e normalmente exibem a assinatura genômica do organismo doador (SOARES et al, 2012, 2016).

Para serem consideradas ilhas genômicas, estas devem apresentar as seguintes características: (i) ausência nos genomas de espécies ou linhagens próximas, porém presentes nos genomas de várias espécies bacterianas; (ii) tamanhos em média de 6 a 200 kb; (iii) divergência no conteúdo GC e no uso de códons, quando comparadas ao restante do genoma; (iv) são flanqueadas por repetições invertidas ou sequências de inserção; (v) geralmente associadas com sítios de RNA transportadores (tRNA), que atuam como alvo para integração; (vi) abrigam sequências de fagos, plasmídeos, sequências de inserção e genes que podem codificar proteínas associadas a elementos genéticos móveis, como transposases, integrases, tirosina recombinase e serina recombinase; (vii) são regiões instáveis, podendo ocorrer sua deleção via repetições invertidas em suas extremidades, através das sequências de inserção ou via recombinação homóloga. Finalmente, apresentam a chamada estrutura mosaico, resultante de vários eventos de inserção (BELLANGER et al, 2014, HACKER; CORNIEL, 2001, LEE et al, 2016, SOARES et al, 2012, 2016).

As ilhas genômicas desempenham um importante papel na plasticidade genômica e conseqüentemente na evolução bacteriana. São identificadas *in silico* através da determinação da composição nucleotídica atípica, inferências filogenéticas, presença de genes relacionados à mobilidade (recombinase/integrases) e tRNA, podendo ser classificadas em ilhas de patogenicidade (PAI), que carregam genes associados a fatores de virulência; ilhas metabólicas, que abrigam genes associados a biossíntese de metabólitos secundários; ilhas de resistência, que carregam genes codificantes de proteínas associadas à resistência aos antibióticos e finalmente, ilhas simbióticas, que carregam um repertório de genes capazes de sustentar uma relação simbiótica com a bactéria hospedeira (GUIMARÃES et al, 2015, HACKER; CORNIEL, 2001, SOARES et al, 2016).

Várias ilhas de patogenicidade foram identificadas em estirpes de corinebactérias patogênicas. No isolado toxigênico de *C. diphtheriae* NCTC 13129, clone responsável pelo surto de difteria nos estados da União Soviética nos anos 90, foram identificadas 13 ilhas de patogenicidade, uma delas contendo o corinefago portador da toxina diftérica. A reanotação deste genoma mais tarde permitiu a identificação de elementos *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) em ilhas de patogenicidade, um importante sistema de defesa bacteriano contra DNA exógeno. Análises comparativas genômicas de 12

estirpes clínicas *C. diphtheriae*, de pacientes com difteria clássica, endocardite e pneumonia, revelaram que na maioria destas estirpes, as ilhas de patogenicidade abrigavam genes relacionados à aderência aos tecidos hospedeiros (CERDENO-TÁRRAGA et al, 2003, D'AFONSECA et al, 2012, TROST et al, 2012).

Estudos realizados em *C. pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes, como carneiros e cabras, foram identificadas sete ilhas de patogenicidade, com genes relacionados à virulência, absorção de ferro, secreção de toxinas, subunidades de fímbrias e fatores de adesão. Este estudo foi expandido e mais 6 ilhas de patogenicidade foram identificadas em *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, uma análise comparativa de 11 genomas de *C. pseudotuberculosis* isolados de diferentes búfalos infectados durante um surto em 2008 no Egito foi realizada e 16 ilhas de patogenicidades foram identificadas, uma delas abrigando um corinefago e o gene da toxina diftérica, podendo ter um importante papel na adaptação de *C. pseudotuberculosis* a este novo hospedeiro (GUIMARÃES et al, 2011, RUIZ et al, 2011, SOARES et al, 2013, VIANA et al, 2017).

Em estudos de genômica comparativa realizados com a cepa tipo do patógeno *C. urealyticum* DSM 7109 e a estirpe clínica *C. urealyticum* DSM 7111, foram identificadas 26 ilhas genômicas em cada um dos genomas. Na cepa tipo DSM 7109, 556 genes estavam presentes em ilhas genômicas e na estirpe DSM 7111, 496 genes. Foram identificados 403 genes nas ilhas genômicas adquiridos pela transferência horizontal de genes. Deste total, apenas 9 genes eram compartilhados entre ambas as estirpes e com outras espécies de corinebactérias, como *C. diphtheriae* NCTC 13129 e *C. pseudotuberculosis* 1002. Este baixo número de genes compartilhados entre espécies diferentes é esperado, uma vez que as espécies citadas possuem habitats diferentes e as ilhas genômicas são adquiridas por transferência horizontal de genes (GUIMARÃES et al, 2015, PERRIN et al, 2002).

São escassos os estudos sobre ilhas genômicas em outras espécies de corinebactérias. Uma região contendo um profago, com forte incidência de transferência horizontal, cuja fonte parece ser de *C. diphtheriae*, foi encontrada na cepa tipo de *C. glutamicum* ATCC 13032, de grande importância industrial. Quatro ilhas genômicas foram identificadas na cepa tipo de *Corynebacterium efficiens* YS-314, isolada de solo e de grande importância industrial na produção de aminoácidos em altas temperaturas. As ilhas identificadas em *C. efficiens* YS-314 contêm genes codificantes de proteínas hipotéticas, transposases e o gene codificante da enzima aspartato quinase, a primeira enzima nas vias de biossíntese de aminoácidos essenciais (metionina, lisina, treonina e isoleucina). Uma ilha genômica de resistência foi encontrada no genoma do isolado clínico multirresistente de *C. kroppenstedtii* CNM633/14, com

similaridade ao plasmídeo pJA144188 de *C. resistens*, incluindo os genes de resistência aos antibióticos *ermX*, *tetW*, *cmx*, *aphA1-IAB*, *strA*, *strB* e *sulI* (FERNÁNDEZ-NATAL et al, 2015, KALINOWSKI et al, 2003, OLIVEIRA et al, 2017, ZHANG; ZHANG, 2005).

1.4.5 Bacteriófagos ou fagos

Os bacteriófagos, também conhecidos como fagos, são um grupo específico de vírus que infectam bactérias, utilizando a maquinaria celular destas para a produção de novas partículas virais. São reconhecidos como os agentes biológicos mais abundantes na Terra, sendo extremamente diversos em tamanho, morfologia e organização genômica. São ubíquos e podem ser encontrados em alimentos, solo, água, esgoto e outros nichos ambientais (SEED et al, 2013, WITTEBOLE; ROOCK; OPAL, 2014).

O genoma dos fagos pode ser composto por uma molécula de DNA ou RNA de fita-simples ou fita-dupla. Tem como característica, a presença de genes essenciais, que codificam replicases específicas, importantes para a replicação e montagem de uma nova partícula viral, e genes que codificam as proteínas do capsídeo, um envoltório protéico que protege o genoma do bacteriófago (DOSS et al, 2017, KASMAN; WHITTEN, 2018, WITTEBOLE; ROOCK; OPAL, 2014).

Geralmente, os fagos são capazes de infectar espécies específicas de bactéria ou subespécies dentro de uma mesma espécie. Essa especificidade é, em parte, mediada por proteínas associadas à cauda, que reconhecem e aderem em determinadas moléculas identificadas na superfície bacteriana. Uma vez que os fagos se aderem ao hospedeiro susceptível, infectam a bactéria com seu material genético e apresentam uma ou duas estratégias de replicação: lítica ou lisogênica. No ciclo lítico, os fagos redirecionam o metabolismo da célula hospedeira para a replicação de novos fagos, culminando na lise e morte da célula hospedeira. No ciclo lisogênico, o genoma do fago é integrado no cromossomo bacteriano ou permanece como um elemento epissomal, onde em ambos os casos, o genoma é replicado e passado para as células bacterianas filhas sem as matar. Os fagos integrados ao genoma bacteriano são chamados de profagos, e replicam junto com o genoma do hospedeiro, até que o ciclo lítico seja induzido, na maioria das vezes em resposta às mudanças nas condições ambientais (DOSS et al, 2017, KASMAN; WHITTEN, 2018).

Do ponto de vista clínico, os fagos são muito significativos, pois codificam muitas toxinas bacterianas altamente patogênicas, de modo que a bactéria hospedeira é patogênica apenas quando infectada por fago codificador de toxina. Exemplos são a toxina da cólera, em

Vibrio cholerae, a toxina diftérica em *C. diphtheriae*, a neurotoxina botulínica em *Clostridium botulinum* e a toxina shiga em espécies de *Shigella*. Essas espécies bacterianas são menos patogênicas ou não patogênicas sem essas toxinas codificadas por fagos. Além disso, os fagos são vetores para a transferência horizontal de genes, que podem incluir genes de resistência aos antimicrobianos. Os fagos também podem ser usados como biomarcadores para a presença de seu hospedeiro em uma amostra ambiental complexa (BOYD, 2012, KASMAN; WHITTEN, 2018).

Em corinebactérias, as cepas toxigênicas de *C. diphtheriae* carregam o gene *tox* estrutural presentes em corinebacteriófagos lisogênicos (β *tox*⁺, γ *tox*⁺, ω *tox*⁺). O gene *tox* codifica a toxina diftérica, o fator de virulência mais bem estudado do bacilo diftérico. Embora o gene *tox* seja parte do genoma de fago, este gene é diretamente regulado pelo repressor *dtxR* (*diphtheria toxin repressor*), que faz parte de um grupo de proteínas reguladoras dependentes de metal. Em ambiente apresentando baixa concentração de ferro, o gene regulador *dtxR* é inibido, resultando no aumento da produção de toxina diftérica. A toxina diftérica é prontamente absorvida através da mucosa do trato respiratório superior e seus efeitos destrutivos são principalmente sobre o coração e o sistema nervoso periférico, embora outros órgãos também possam ser afetados e o indivíduo susceptível apresentar todas as manifestações tóxicas que ocorrem após uma infecção da faringe (DIAS et al, 2011, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011).

Estudos constataram a capacidade do corinebacteriófago β em infectar cepas de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, constituindo risco para o surgimento de quadros de difteria em humanos e animais causados por tais espécies (DIAS et al, 2011, MATTOS-GUARALDI; HIRATA JR; DAMASCO, 2011, SIMPSON-LOUREDO et al, 2014).

Em corinebactérias não patogênicas, como em *C. glutamicum*, espécie produtora de aminoácidos na indústria, vários bacteriófagos têm sido isolados, com destaque para um corinebacteriófago virulento que foi amplamente isolado nas instalações da produção de aminoácidos, sendo o responsável em reduzir significativamente a produtividade através do crescimento lento e lise de culturas bacterianas (SANGAL; HOSKISSON, 2014).

1.4.6 Elementos CRISPR

Os elementos agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente espaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* - CRISPR)

foram primeiramente descritos no genoma de *E. coli* em 1987 e subsequentemente reportados em outros organismos. Tais elementos consistem em pequenas porções do DNA bacteriano compostas por repetições de nucleotídeos. Cada uma dessas repetições, de aproximadamente 24 a 47 pb, encontra-se adjacente a um espaçador de DNA, que corresponde a uma região não codificante inserida no DNA bacteriano após o contato com genomas invasores provenientes de bacteriófagos ou plasmídeos, e em alguns casos, RNA. Esse arranjo é acompanhado por uma sequência “líder” que na maioria dos casos inclui uma região promotora que inicia a transcrição unidirecional através das repetições de CRISPR e espaçadores (BARRANGOU, 2013, GRISSA; VERGNAUDE; POURCEL, 2007, LEVASSEUR et al, 2016, MAKAROVA et al, 2015, WIEDENHEFT; STERNBERG; DOUDNA, 2012).

Os elementos CRISPR estão presentes na maioria das arqueas (~87%) e muitas bactérias (~50%), que adquirem imunidade a elementos genéticos invasores, através da incorporação de fragmentos curtos de DNA exógeno em seus genomas. Em associação com as *CRISPR associated proteins* (Cas), o sistema CRISPR-Cas é formado e este cliva e elimina o DNA invasor, sendo assim um sistema imunológico adaptativo que protege a bactéria contra fagos e plasmídeos, além de participar de atividades regulatórias em nível transcricional (BARRANGOU; HORVATH, 2012, BARRANGOU, 2013, MARAKOVA et al, 2015).

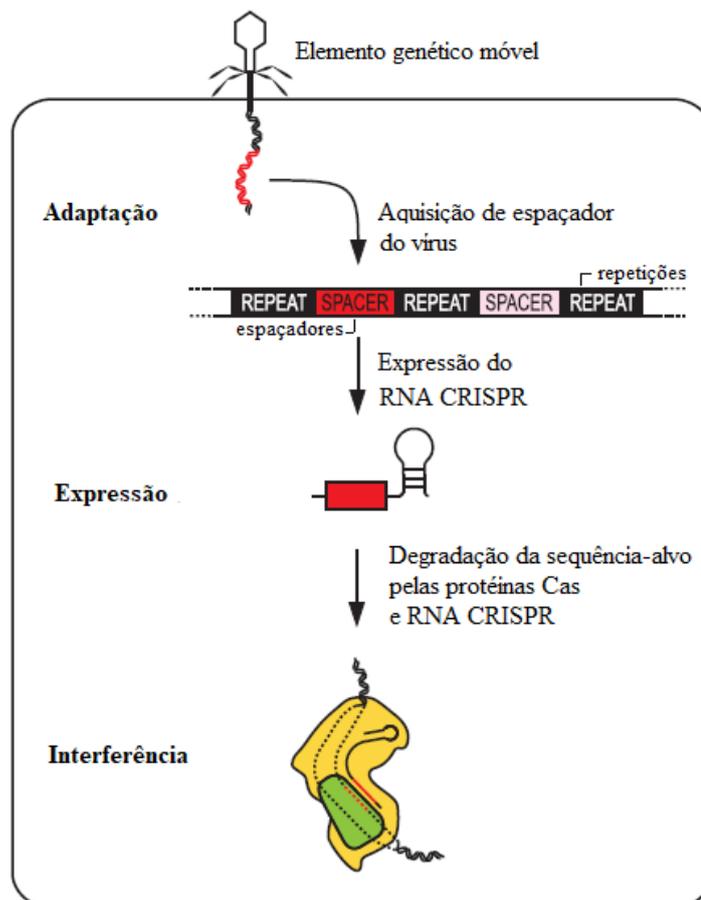
O sistema CRISPR-Cas pode ser observado tanto em DNA cromossômico como em plasmídeos. Há uma vasta diferença na sua distribuição, número, tamanho e componentes entre sistemas e organismos. O sistema CRISPR-Cas é classificado em três principais tipos (I, II e III) baseados em seu conteúdo genético, diferenças no processamento do crRNA e interferência molecular, que ilustram suas diferenças estruturais, funcionais e evolutivas (BARRANGOU, 2013, OSTRIA-HERNÁNDEZ et al, 2015, RATH et al, 2015). Mudanças rápidas ocorrem em numerosos sistemas CRISPR-Cas devido a transferência horizontal de *loci* completos ou módulos individuais deste sistema, que complicam uma classificação filogenética mais simples (MAKAROVA et al, 2015). Atualmente, a classificação proposta por Makarova et al (2015) combina a análise de assinaturas das famílias de proteínas Cas e características da arquitetura do *loci* e abrange duas classes, cinco tipos e 16 subtipos.

Cada tipo de sistema CRISPR-Cas possui uma proteína Cas de “assinatura”, sendo que o tipo I possui a Cas3 helicase-nuclease; o sistema tipo II possui Cas9 multidomínios, Cas1 e Cas2 e o tipo III possui a proteína Cas10 multidomínios. Os principais genes *cas* são caracterizados pela sua proximidade aos *loci* CRISPR. Os genes *cas* codificam as proteínas Cas, que podem ter domínios de nuclease, helicase, polimerase e várias proteínas de ligação ao RNA. O número de genes *cas* pode variar de 4 a mais de 20 e o produto desses genes, as

proteínas Cas, fornecem a maquinaria enzimática necessária para a aquisição de espaçadores, bem como para a marcação de elementos invasores (BARRANGOU, 2013, MAKAROVA et al, 2015, OSTRIA-HERNÁNDEZ et al, 2015, RATH et al, 2015).

O sistema imunológico adaptativo envolve três estágios distintos: adaptação, expressão e interferência (**Figura 2**). O estágio de adaptação envolve a incorporação de fragmentos do DNA exógeno (conhecido como protoespaçador), oriundo de vírus e plasmídeos no arranjo CRISPR como novos espaçadores. Esses espaçadores fornecem a memória sequência para uma defesa direcionada contra invasões subsequentes, como vírus ou plasmídeos correspondentes. Durante o estágio de expressão, o arranjo CRISPR é transcrito produzindo um precursor (pré-crRNA), que é processado e maduro para produzir RNA CRISPR, conhecidos como crRNA. No estágio de interferência, os crRNA são auxiliados pelas proteínas Cas, que funcionam como guias para direcionar especificamente e clivar DNA invasores (BARRANGOU, 2013, LEON; MENDOZA; BONDY-DENOMY, 2018, MARAKOVA et al, 2015, WIEDENHEFT; STERNBERG; DOUDNA, 2012).

Figura 2 - Esquematização dos três estágios do processo de defesa bacteriana pelo sistema CRISPR-Cas.



O sistema CRISPR-Cas vem sendo utilizado como uma plataforma de edição genômica para mudanças em sequências-alvo de genomas de células vivas, de baixo custo e menor complexidade comparado a outras técnicas já existentes, representando um caminho promissor para o tratamento de doenças genéticas e pesquisas nas áreas da biologia, biotecnologia e biomedicina (SANDER; JOUNG, 2014).

O potencial antimicrobiano seletivo de antimicrobianos baseados em CRISPR tem sido relatado. Considerando que este sistema tenha sido originalmente desenvolvido para proteger a integridade dos genomas bacterianos, este pode ser reaproveitado para o auto-direcionamento letal, culminando na eliminação bacteriana, uma vez que as bactérias têm acesso limitado a vias complexas e avançadas de reparo de DNA - em comparação com células eucarióticas -, tornando-as particularmente susceptíveis a danos no DNA genômico. Consequentemente, isto pode ser aproveitado para conduzir morte específica e programável de populações bacterianas, removendo genótipos bacterianos de interesse na prevenção de doenças infecciosas e para promover a saúde dos animais e plantas (BARRANGOU; HORVATH, 2017).

1.5 Tipagem molecular por *pulsed field gel electrophoresis*

A tipificação molecular pela técnica de eletroforese em gel sob campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) é empregada para separar grandes fragmentos de DNA por eletroforese em campo elétrico pulsado, onde aplica-se campos elétricos alternados que forcem as moléculas de DNA a mudar continuamente de direção de migração. Quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para a sua reorientação e é nesta diferença dos tempos de reorientação que se baseia a separação das moléculas (MAGALHÃES, 2005, SINGH et al, 2006). O critério interpretativo mais utilizado para a comparação dos perfis eletroforéticos é o descrito por Tenover et al (1995). Existem programas que avaliam os perfis de diversidade das amostras, onde a matriz de similaridade das amostras é realizada a partir das imagens dos géis, dentre eles o mais utilizado é o Bionumerics (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica).

A técnica de PFGE permite a caracterização de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários. A caracterização de linhagens patogênicas é fundamental para fins epidemiológicos, assim o PFGE pode ser empregado em estudos de surtos hospitalares e comparação de populações microbianas de diferentes regiões (MAGALHÃES, 2005, SINGH,

2006). Esta metodologia tem sido empregada para avaliar a diversidade clonal das linhagens de *C. striatum* multirresistentes em surtos hospitalares em diversos países (ALIBI et al, 2017, NAVAS et al, 2016, WANG et al, 2016).

1.6 Tipagem molecular por *multilocus sequence typing*

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST) é um método de tipagem molecular que utiliza o sequenciamento e análise de fragmentos de 3 a 7 genes constitutivos e vem sendo utilizado por diversos pesquisadores para diferentes espécies bacterianas com o intuito de agrupar linhagens relacionadas em complexos clonais. Além da investigação epidemiológica, este método pode ser utilizado para inferências filogenéticas (TURNER; FEIL, 2007), com a vantagem de ser altamente reprodutível e seus resultados poderem ser compartilhados *online* (MAIDEN et al, 1998).

De acordo com as mutações encontradas na sequência determina-se o número de genes alelos para aquele *locus*. Para cada gene, as sequências são referidas como alelos e o conjunto de diferentes alelos provém um perfil alélico que define o *sequence type* (ST) de cada amostra bacteriana. Grupos com o mesmo perfil de alelos representam clones ou linhagens. As sequências que diferem em apenas um nucleotídeo são consideradas alelos diferentes. Os ST podem ser agrupados em complexos clonais, devido a sua similaridade com um genótipo central. Este genótipo central é identificado a partir de análises heurísticas utilizando o algoritmo *BURST* (MAIDEN et al, 1998, URWIN; MAIDEN, 2003, GEVERS et al, 2005).

C. diphtheriae é a única espécie do gênero *Corynebacterium* que possui um esquema de MLST validado e um banco de dados no PubMLST (<http://pubmlst.org/cdiphtheriae/>). Para *Corynebacterium ulcerans*, o mesmo esquema utilizado para *C. diphtheriae* foi proposto por König et al (2014), mas esta espécie não possui banco de dados validado. Outros esquemas de MLST utilizando genes constitutivos distintos do esquema de *C. diphtheriae* foram propostos para as espécies *C. macginley* (EGUCHI et al, 2008) e *C. striatum* (GOMILA et al, 2012, RENOM et al, 2014), mas estas espécies também não possuem bancos de dados no PubMLST.

1.7 Sequenciamento genômico da nova geração

A primeira bactéria a ter a sequência de nucleotídeos de seu genoma foi *Haemophilus influenzae*, em 1995. No início da era genômica, o sequenciamento de genomas era baseado

na metodologia de Sanger, na qual o DNA era fragmentado aleatoriamente em tamanhos relativamente pequenos (2.000-5.000 pb), subclonado em vetores plasmidiais e então submetidos ao sequenciamento. Esta estratégia, denominada *shotgun*, onde as sequências obtidas a partir de cada clone (denominadas *reads*), com tamanho médio de 600 a 800 pb, eram submetidas ao processamento para retirada de sequências de baixa qualidade e utilizadas para montar os *contigs* (união de duas ou mais sequências de *reads*) e genomas (SIMPSON; PARRA; PEREZ, 2004, STAATS; MORAIS; MARGIS, 2014).

As novas metodologias de sequenciamento de genomas, denominadas sequenciamento da nova geração (*next-generation sequencing* - NGS) ou sequenciamento de alta vazão, tais como Illumina, Ion Torrent, dentre outros, são métodos que também utilizam a fragmentação aleatória do DNA genômico, mas geralmente não é necessário realizar a clonagem. A obtenção de *reads* ocorre de maneira muito mais rápida, entretanto, possuem tamanhos menores, variando de algumas dezenas a poucas centenas de pares de bases. Esses *reads* passam por um controle de qualidade, assim como na metodologia de Sanger e então podem ser utilizados na montagem de genomas (CARVALHO; SILVA, 2010).

Alguns índices de qualidade são utilizados na montagem dos genomas. A cobertura reflete a quantidade de *reads* associados a um determinado fragmento de DNA. O N50 é outra medida estatística importante, utilizada para avaliar a qualidade da montagem, visto que revela o quanto de um genoma é coberto por *contigs* grandes (STAATS; MORAIS; MARGIS, 2014).

1.8 Taxonomia genômica

Taxonomia é a ciência que lida com a classificação, nomenclatura e identificação dos organismos (THOMPSON; OLIVEIRA, 2006). Atualmente, a taxonomia de procariontes é uma abordagem polifásica, na qual integra informações fenotípicas, quimiotaxonômicas e genotípicas para classificar espécies de bactérias. A caracterização genotípica é um componente essencial na descrição de espécies. As análises filogenéticas baseadas nas sequências do gene ribossomal 16S e a determinação da similaridade entre as sequências constituem a primeira etapa na identificação de novos organismos (CHUN; RAINEY, 2014). Espécie bacteriana é definida como um grupo de cepas (incluindo a cepa tipo), que compartilha acima de 70% de similaridade na hibridização DNA-DNA (DDH), com ΔT_m abaixo de 5°C (diferença entre as temperaturas de *melting*, parâmetro utilizado para quantificar o grau de similaridade entre os genomas durante a hibridização); menos de 5% de

diferença no conteúdo guanina-citosina (% mol. GC) (COLSTON et al, 2014, THOMPSON et al, 2013) e acima de 98,7% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA (STACKEBRANDT, EBERS, 2006). A DDH é ainda considerada a metodologia “padrão-ouro” para definição de espécie (THOMPSON et al, 2013). Esta metodologia quantifica a eficiência de hibridização entre as moléculas de DNA baseada na comparação entre dois genomas. Porém, a DDH é uma técnica laboriosa e poucos laboratórios dispõem desta metodologia (TINDALL et al, 2010).

Atualmente, na era da genômica e da computação, a taxonomia microbiana vem sofrendo uma importante revolução, com o advento de técnicas rápidas de sequenciamento de genomas completo e com o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática, que utilizam métricas baseadas em assinaturas genômicas intraespecíficas para classificar, reclassificar e criar nomenclaturas para taxas, sendo especialmente útil em estirpes bacterianas incultiváveis (GEVERS et al, 2005, KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005, THOMPSON; OLIVEIRA, 2006, THOMPSON et al, 2013), tais como: Identidade Média de Nucleotídeos, Identidade Média de Aminoácidos, Assinatura Genômica de Karlin e DDH *in silico*.

A identidade média de nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity* - ANI) é uma abordagem que utiliza a similaridade de sequência onde aquelas com identidade >96% pertenceriam a uma mesma espécie. Este limite tem uma forte correlação com o padrão-ouro de 70% da abordagem de hibridização, sendo assim um poderoso descritor de relação genética entre pares de genomas DNA-DNA (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005, TINDALL et al, 2010, YOON et al, 2017).

Assim como a ANI, a identidade média de aminoácidos (*Average Aminoacid Identity* - AAI), estabelece que as estirpes de uma mesma espécie compartilham valores acima de 95-96% de similaridade. Esta abordagem é calculada a partir dos genes conservados codificantes de proteínas entre um par de genomas que são determinados pela comparação das sequências usando o algoritmo BLAST. A relação genética entre os pares de genomas é medida pela identidade média de aminoácidos de todos os genes conservados entre os dois genomas (THOMPSON et al, 2013).

Os genomas apresentam padrões na sua sequência nucleotídica, que são chamados de assinaturas genômicas, que permitem a distinção entre espécies filogeneticamente próximas ou distantes. Os genomas podem ser identificados por suas assinaturas e as dissimilaridades entre as assinaturas são usadas para estimar a distância evolucionária entre as espécies. A Assinatura Genômica de Karlin é um cálculo matemático que observa a abundância relativa de mono, di, tri ou tetranucleotídeos, que deve ser semelhante entre espécies intimamente

relacionadas (valores abaixo de 10) e diferentes entre espécies não relacionadas (JERNIGAN; BARAN, 2002, KARLIN; BURGE, 1995).

A DDH *in silico* mimetiza a DDH laboratorial, onde as distâncias entre um par de genomas são determinadas e os valores acima de 70 % de similaridade na hibridização são utilizados para delimitação de espécies (MEIER-KOLTHOFF et al, 2013).

Outras abordagens da taxonomia genômica incluem a análise de dados por Análise de Sequências de Múltiplos *loci* (MLSA) (CHUN; RAINEY, 2014) e a construção de super-árvores (THOMPSON; OLIVEIRA, 2006). O MLSA estabelece a identificação e a classificação microbiana com base na informação taxonômica e filogenética disponível. Na metodologia de MLSA são utilizados grupos de linhagens representativas de um gênero, sendo utilizados procedimentos de análise filogenética com base na sequência de nucleotídeos de genes (alelos) que estejam presentes em todas as linhagens representativas de um táxon em estudo (gênero ou família). Esta metodologia tem permitido a discriminação em nível de espécie onde, inicialmente, os organismos são identificados em nível de gênero ou família com base no gene ribossomal 16S e, posteriormente, identificados em nível de espécie com base na metodologia de MLSA (CHUN; RAINEY, 2014, BARCELLOS et al, 2015). As super-árvores consistem na reconstrução de árvores filogenéticas mais robustas, baseadas na concatenação de genes conservados entre os genomas (genes do genoma core) (THOMPSON et al, 2013).

1.9 Justificativa

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz (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, como as unidades hospitalares.

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. Métodos rápidos e acurados na identificação das corinebactérias têm contribuído para um aumento de relatos de infecções invasivas por estas espécies, que eram consideradas apenas como colonizadoras do ambiente, da microbiota humana ou de animais.

Estudos recentes têm demonstrado a emergência de cepas multirresistentes de *C. striatum* em surtos nosocomiais em diversos países. A epidemiologia molecular de *C. striatum* associada à compreensão de seus mecanismos de resistência são considerados pontos fundamentais para o desenvolvimento de programas efetivos de controle de infecções hospitalares. Os dados que foram gerados a partir deste trabalho, além de serem significantes sob o ponto de vista da genética da resistência em *Corynebacterium*, também fornecem informações importantes sobre a prevalência de *C. striatum* num hospital público brasileiro, onde não há ainda nenhum estudo a respeito dos aspectos aqui abordados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho tem como objetivo principal analisar a diversidade genética das estirpes de *C. striatum* isoladas de espécimes clínicos e realizar a caracterização genética da resistência, utilizando dados do sequenciamento genômico.

2.2 Específicos

- Pesquisar os genes envolvidos na resistência aos antimicrobianos, tais como *aphA*, *ermX*, *cmx*, *gyrA* e *tetAB*, além do gene *repB*, envolvido na replicação do plasmídeo que confere multirresistência em *C. striatum*;
- Pesquisar a presença de integrons, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Determinar a diversidade genética das estirpes de *C. striatum* utilizando a metodologia de PFGE;
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por micro-organismos Gram-positivos;
- Sequenciar e analisar o genoma completo de 10 estirpes de *C. striatum*, de acordo com os perfis eletroforéticos e em relação à presença de genes de resistência e integrase;
- Investigar a taxonomia genômica das estirpes de *C. striatum* utilizando abordagens *in silico*;
- Determinar a diversidade genética das estirpes de *C. striatum* utilizando os esquemas de MLST propostos para corinebactérias;
- Avaliar o poder discriminatório dos métodos de tipagem molecular utilizados neste estudo (PFGE x MLST);
- Realizar a caracterização genética da resistência de *C. striatum*;
- Caracterizar o mobiloma das estirpes de *C. striatum*.

3 METODOLOGIA

3.1 Conservação das estirpes e preparo da cultura bacteriana

Neste estudo, foram analisadas 21 estirpes de *C. striatum* (**Tabela 2**), isoladas de sítios intravenosos de pacientes internados no HUPE/UERJ, com exceção de uma estirpe oriunda de outra instituição hospitalar que foi encaminhada ao Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC)/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) para identificação, uma vez que o LDCIC atua como Centro Colaborador da Difteria e Corinebacterioses junto ao Ministério da Saúde. Todas as estirpes bacterianas do LDCIC/UERJ utilizadas neste estudo foram depositadas na Coleção de Culturas do Ambiente e Saúde (CBAS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As estirpes encontram-se estocadas em temperaturas de -20°C e -80°C em *Skim Milk* com 20% de Glicerol e *Tryptic Soy Broth* (TSB) com 15% de glicerol. Os micro-organismos foram cultivados em *Columbia Agar Base* (CAB) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubados por 24/48 h a 37°C.

Tabela 2 - Dados das 21 estirpes de *C. striatum* utilizadas neste estudo

Estirpe	Mês e Ano de isolamento	Unidade Hospitalar ¹	Sexo/Idade ²	Sítio ³	Bactéria associada ⁴	Número depósito CBAS
2089	04/2010	CTI Geral/HUPE	M/64	Pta. de cateter	Não	CBAS 647
2091	04/2010	DIP/HUPE	F/40	Sangue	<i>Acinetobacter</i> sp.	CBAS 648
2103	05/2010	DIP/HUPE	F/NI	Pta. de cateter	Não	CBAS 649
2130	08/2010	Dermatologia/ HUPE	F/30	Sangue	Não	CBAS 612
2228	02/2011	Unidade coronariana/HUPE	F/92	Sangue	Não	CBAS 650
2230	02/2011	UI Clínica/HUPE	M/56	Sangue	Não	CBAS 617
2237	03/2011	UI Clínica/HUPE	M/56	Sangue	Não	CBAS 616
2243	03/2011	AMI/HUPE	F/NI	Sangue	Não	CBAS 651
2245	03/2011	CTI Geral/HUPE	M/78	Pta.de cateter	Não	CBAS 652
2285	06/2011	CTI/HUPE	F/36	Cateter venoso	Não	CBAS 653

Tabela 2 (continuação)

Estirpe	Mês e Ano de isolamento	Unidade Hospitalar ¹	Sexo/Idade ²	Sítio ³	Bactéria associada ⁴	Número depósito CBAS ⁵
2296	07/2011	Hosp. Mun. De Jesus	M/NI	Cateter venoso	NI	CBAS 615
2308	08/2011	Hematologia/HUPE	M/NI	Sangue	Não	CBAS 614
2316	08/2011	Ortopedia/HUPE	M/17	Sangue	SCN	CBAS 654
2324	10/2011	Pneumologia/HUPE	F/73	Cateter	SCN	CBAS 655
2376	04/2012	UTI Neonatal/HUPE	F/3meses	Pta. de cateter	Não	CBAS 656
2390	05/2012	UCIPG/HUPE	F/63	Pta. de cateter	Não	CBAS 657
2401	06/2012	Cir. Torácica/HUPE	M/62	Sangue	Não	CBAS 658
2425	08/2012	Hematologia/HUPE	F/10	Sangue	Não	CBAS 620
2432	09/2012	Pediatria/HUPE	F/10	Sangue	Não	CBAS 659
2439	11/2012	UCIPG/HUPE	M/83	Pta. de cateter	Não	CBAS 660
2454	02/2013	UCIPG/HUPE	F/57	Pta. de cateter	SCN/ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CBAS 661

¹ AMI: Ambulatório; Cir. Torácica: Cirurgia Torácica; CTI: Centro de Terapia Intensiva; DIP: Doenças Infetoparasitárias; Hosp.: Hospital; Mun. Municipal; UCIPG: Unidade Clínica Intermediária do Plantão Geral; UI: Unidade Intermediária; HUPE: Hospital Universitário Pedro Ernesto. ² F: feminino; M: masculino; NI: dado não informado; ³ Pta.: Ponta; ⁴ SCN: *Staphylococcus coagulase-negativa*; ⁵ CBAS: Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde.

Fonte: (Da autora, 2018).

Estas estirpes foram isoladas no período de 2010 a 2013, caracterizadas previamente por métodos fenotípicos (bioquímica convencional e sistemas API Coryne e Vitek 2) e moleculares (análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*). As sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB* encontram-se depositadas no Genbank/NCBI sob os números de acesso: KJ934779-KJ934789, KM001910-KM001914, KJ855309-KJ855313, KR010627-KR010645, KR020513 e KR020514.

A maioria das estirpes foi susceptível apenas à tetraciclina, à vancomicina e à linezolida (ANEXO A), pelo método de disco-difusão, conforme os pontos de corte definidos para *Corynebacterium* spp. pelo documento BrCAST (2017). O teste de sensibilidade aos antimicrobianos está presente no ANEXO A (RAMOS, 2014).

3.2 Pesquisa dos genes de resistência e integrase

3.2.1 Extração do DNA total

Todas as 21 estirpes foram inoculadas em tubos contendo 3 ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 37°C por 24/48 h. Alíquotas de 2 ml da cultura de cada estirpe foram transferidas para microtubos e centrifugados a 3.000 x G por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspenso em 500 µl de água mili-Q estéril e submetido 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 (16.000 x G por 15 s). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C (BAIO et al, 2013).

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Para a amplificação de regiões específicas do genoma das estirpes, as PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl. As reações individuais foram compostas de água ultrapura esterilizada livre de DNase/RNase, tampão de reação 1X (Promega), 3 mM de MgCl₂ (Promega), 0,2 mM de cada dNTP (dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], Invitrogen), 100 ng de cada iniciador (*forward* e *reverse*), 1,5 U da enzima *Taq* polimerase (Promega) e 3 µl do DNA (20 µg/µl) obtido pela extração por choque térmico.

A amplificação dos genes de resistência foi realizada nas condições propostas por Gomila et al (2012). Já a amplificação do gene da integrase classe I foi realizada nas condições propostas por Fonseca et al (2005). As sequências dos iniciadores que foram utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento são mostradas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para as reações de amplificação e sequenciamento dos genes de resistência e de enzimas realizados neste estudo.

Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Fragmento (pb)	Função	Referências
<i>aphA</i> F	GGCAAGATCCTGGTATCGGTCT	480	Resistência ao aminoglicosídeo	Gomila et al, 2012.
<i>aphA</i> R	AGACTAAACTGGCTGACGGCAT			
<i>cmx</i> F	AGTCGGTATGGTCGTCGGC	879	Resistência ao cloranfenicol	Gomila et al, 2012.
<i>cmx</i> R	GCTCCGATATTCAATGCTGCG			
<i>ermX</i> F	AACCATGATTGTGTTTCTGAACG	566	Resistência à eritromicina e à clindamicina	Gomila et al, 2012.
<i>ermX</i> R	ACCAGGAAGCGGTGCCCT			
<i>tetA</i> F	TTAGCGTTCGGCGACCTGG	1829	Resistência à tetraciclina, à oxitetraciclina e à oxacilina	Gomila et al, 2012.
<i>tetB</i> R	AACTGGGTGCCTTCAGGGTC			
<i>repB</i> F	CGATCTGGAATTTGTCTGCCGT	875	Replicação de plasmídeos	Gomila et al, 2012.
<i>repB</i> R	CTGGTTGATAGACCCCGTGT			
<i>intI</i> F	AAAACCGCCACTGCGCCGTTA	400	Gene da integrase classe 1	Fonseca et al, 2005.
<i>intI</i> F	AAAACCGCCACTGCGCCGTTA			
<i>gyrA1</i>	GCGGCTACGTAAGTCC	400	Girase	Sierra et al, 2005.
<i>gyrA2</i>	CCGCCGGAGCCGTTTCAT			

Fonte: (adaptado de FONSECA et al, 2005, GOMILA et al, 2012, SIERRA et al, 2005).

3.2.3 Eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Os géis de agarose foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TAE 1X de modo a obter uma concentração de 1,5%. Foram aplicados 5 µl do produto da PCR e 1 µl de marcador de peso molecular nos poços do gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 60 V por 1 h. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/ml) e visualizado com o equipamento ImageQuant 300 (GE).

3.2.4 Purificação dos produtos da PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit PCR DNA and Gel Banda Purification Kit -GE Healthcare* conforme as instruções do fabricante. Para a purificação dos produtos da PCR com bandas inespecíficas foi empregado o E-gel (Invitrogen), um sistema de eletroforese em gel de agarose corado com SYBR Safe. Foi utilizado o gel CloneWell 0,8% (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante.

3.2.5 Determinação das sequências nucleotídicas

O DNA purificado na etapa anterior foi utilizado como molde para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems - Catálogo 4336919), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente os produtos desta reação foram precipitados com 80 µl de uma solução de 75% de isopropanol, centrifugados por 45 min. a 2.800 x G 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 140 x G a 21°C e o processo de secagem feito no termociclador a 75°C por 5 min. Os sedimentos foram então ressuspensos em 10 µl de formamida, centrifugados por 1 min. a 140 x G a 21°C, incubados a 95°C por 5 min. 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 usando o programa SeqMan (DNASTAR, Lasergene) e comparadas àquelas depositadas no banco de sequências Genebank.

3.3 PFGE

As 21 estirpes de *C. striatum* foram submetidas à genotipagem por PFGE e uma estirpe representante de cada pulsotipo (I, II, III e IV) anteriormente identificadas no surto ocorrido no mesmo hospital (BAIO et al, 2013) foram utilizadas como referências.

As estirpes foram semeadas em meio CAB suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e foram incubadas por 48 h a 37°C. As suspensões bacterianas foram obtidas a partir do crescimento em tubo contendo 3 mL de caldo BHI. Os tubos foram incubados por aproximadamente 2 h a 37°C ou até atingir a escala 2 de McFarland. Após a incubação, 2 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para microtubos e centrifugados a 10.000 x G por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 µl de tampão PIV e 200 µl de agarose a 2% (NuSieve® GTG® agarose, BioWhittaker Molecular Applications). A solução foi homogeneizada cautelosamente com a ponteira e então dispensada no interior de um canudo estéril. Os canudos foram armazenados na geladeira por 5 min., aproximadamente. Com o auxílio de um *swab* e bisturi estéreis, os blocos de agarose foram cortados e colocados em um tubo com 2 mL de solução de lise. Esses tubos foram incubados por 24 h a 37°C. Após este período, a solução de lise foi retirada com o auxílio de

um bulbo estéril e foram adicionados 2 mL da solução contendo EDTA 0,5 M, Sarcosina 1% e proteinase K 1 mg/mL. Os tubos foram incubados durante a noite a 50°C.

Em novos tubos contendo 4 mL de TE 1X foram adicionados 4 blocos de agarose. Os tubos com o restante dos blocos foram armazenados na geladeira. Os blocos selecionados foram lavados com TE 1X seis vezes por dia durante 2 dias consecutivos. Após a etapa da lavagem, o tampão TE 1X foi retirado e 200 µl da solução contendo a enzima de restrição SwaI (40 unidades por estirpe), tampão 1X e soro albumina bovina (BSA) 0,01%, conforme o trabalho publicado por Baio et al (2013).

Foram preparados 2,5 L do tampão de corrida TBE 0,5 X. O gel de agarose a 1,2 % foi preparado utilizando 100 mL do TBE 0,5 X e 1,2 g de agarose *Low Melting* (NA, Amersham Biosciences). Após o período de incubação, a solução contendo a enzima foi retirada e os tubos colocados no banho seco a 68,5°C para inativar a enzima e derreter a agarose para aplicação no gel. No gel foram aplicados 60 µl de cada estirpe e o peso molecular de 50-1000 kb (Lambda PFG Marker- BioLabs). Após a aplicação, o gel foi colocado no aparelho de PFGE CHEF DRII System (Bio-Rad) e foi iniciada a eletroforese nas seguintes condições de corrida: pulsos de 1-30 s por 22 h sob uma tensão de 6 V/cm, angulação 120° e temperatura de 13°C.

Foi realizada a inspeção visual dos perfis de bandas gerados, onde os critérios de Tenover et al (1995) foram aplicados. O programa *Bionumerics* versão 6.1 (Applied Maths, Sint Martens Latem, Bélgica) foi utilizado para construir a matriz de similaridade entre as estirpes a partir das imagens dos géis, com o método Dice e uma tolerância de posição de 1% e foi construído um dendrograma pelo método de UPGMA. As estirpes foram consideradas pertencentes ao mesmo pulstotipo se os perfis apresentassem índices de similaridade $\geq 85\%$ baseado nos coeficientes de similaridade baseados nas bandas (SIMPSON et al, 2013).

3.4 Análise fenotípica da resistência

A concentração inibitória mínima (CIM) das 10 estirpes cujos genomas foram escolhidos para o sequenciamento (descritos no próximo tópico) foi determinada por difusão em gradiente de concentração em meio de ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubado a 37°C por 24 e 48 h (MCELVANIA TEKIPPE et al, 2014). A partir de uma cultura pura de cada estirpe, uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland em salina a 0,9% foi preparada. Os antimicrobianos utilizados e suas devidas concentrações são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Antimicrobianos utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das estirpes de *C. striatum*.

Classe antimicrobiana	Agente antimicrobiano	Concentração (mg/L)
Beta-lactâmicos	Penicilina	0,015-256
	Ampicilina	0,016-256
	Oxacilina	0,016-256
Cefalosporinas	Cefepime	0,016-256
	Cefotaxime	0,016-256
	Ceftriaxona	0,016-256
Carbapenêmicos	Meropenem	0,002-32
	Imipenem	0,002-32
Tetraciclina	Tetraciclina	0,015-256
Ansamicina	Rifampicina	0,002-32
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0,06-1024
	Amicacina	0,016-256
Oxazolidinona	Linezolida	0,016-256
Quinolonas	Ciprofloxacino	0,002-32
	Levofloxacino	0,002-32
	Moxifloxacino	0,002-32
Macrolídeos	Eritromicina	0,015-256
Lincosamida	Clindamicina	0,015-256
Lipopeptídeo	Daptomicina	0,015-256
Glicopeptídeo	Vancomicina	0,015-256
Inibidor da via do folato	Trimetoprim-Sulfametoxazol (1/19)	0,002-32

Fonte: (Da autora, 2018).

A cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 foi utilizada como padrão susceptível. A definição da resistência foi baseada nos valores de corte definidos pelo CLSI, documento M45-A2 (2010) e também pelo documento do BrCAST (2017). Para os antimicrobianos sem definição de pontos de corte para corinebactérias em ambos os documentos, foram utilizados os pontos de corte para *Staphylococcus* spp. (ALIBI et al, 2017).

A estreptomicina (10 µg) foi testada pelo método de disco-difusão em meio de ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubado a 37°C por 24 h, a partir de uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland em salina a 0,9%. Como não há pontos de corte para corinebactérias, os pontos de corte para *Staphylococcus* spp. foram utilizados (BrCAST, 2017, CAMELLO et al, 2003, CLSI, 2016, MARTINEZ-MARTINEZ, 1994, MARTINS et al, 2009).

3.5 Sequenciamento dos genomas

De acordo com os perfis eletroforéticos obtidos pelo PFGE, a presença de integrase e de genes de resistência, cinco estirpes foram escolhidas para o sequenciamento do genoma pela Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz.

Outras cinco estirpes foram sequenciadas pela plataforma Ion Torrent (Life Technologies) em colaboração com as Universidades Federais da Bahia (UFBA), do Pará (UFPA) e de Minas Gerais (UFMG) e acrescentadas às nossas análises. Quatro destas estirpes foram isoladas durante o surto ocorrido em 2009 no HUPE, relatado por Baio e colaboradores (2013).

3.5.1 Extração do DNA Genômico para o sequenciamento de alta vazão

O DNA genômico das estirpes foi extraído utilizando o *kit PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

3.5.2 Sequenciamento e montagem dos genomas

As reações de sequenciamento dos genomas de cinco estirpes foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho da Fiocruz do IOC/Fiocruz, utilizando o sequenciador Illumina HiSeq 2500. O preparo da biblioteca foi feito usando o *kit Nextera (XT)*. Uma vez disponível a biblioteca com tamanhos esperados, esses fragmentos de DNA foram ligados aos adaptadores em ambas as extremidades (*paired-end reads*), gerando sequências identificadas como R1 e R2 no formato fastq. Outras cinco estirpes foram sequenciadas com o 318 chip da plataforma Ion Torrent (UFBA/UFPA/UFMG).

Todas as sequências geradas tiveram a qualidade checada utilizando o programa FastQC, versão 0.11.2 (ANDREWS, 2010). Após a avaliação da qualidade, os genomas foram montados utilizando os programas MIRA (CHEVREUX; WETTER; SUHAI, 1999) e SPAdes (BANKEVICH et al, 2012) e curados pelo Lasergene v.11 Suite DNASTAR, para reduzir os *gaps* (PACHECO et al, 2015). Os *contigs* gerados na montagem dos genomas foram

alinhados e ordenados utilizando o programa Mauve, versão 2.0 (DARLING; MAU; PERNA, 2010), usando como referência genomas completos filogeneticamente próximos a *C. striatum*.

Como os genomas podem conter informações indesejadas originadas de contaminação por células ou DNA de outros organismos, os genomas montados foram submetidos aos softwares *Automated Contamination Detection and Confidence estimation for single-cell genome data* (ACDC) e *Contamination Estimator by 16S (ContEst16S)* para pesquisa de contaminantes. O primeiro foi desenvolvido para detectar contaminantes em genomas sequenciados a partir de uma única célula, com detecção baseada em bancos de dados. O segundo utiliza um marcador filogenético robusto que não é facilmente submetido à transferência lateral de genes, assim, todos os fragmentos do gene 16S rRNA do genoma montado são analisados e os genes recuperados são alinhados e uma árvore filogenética é construída ao final (LUX et al, 2016, LEE et al, 2017).

Após o alinhamento e verificação de contaminantes, os genomas foram submetidos à anotação automática pelo servidor *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST), versão 2.0 (AZIZ et al, 2008) e também pelo *Prokaryotic Genome Annotation* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), onde foram depositados.

3.6 Ferramentas de bioinformática

3.6.1 Abordagens *in silico* de taxonomia genômica

Diferentes abordagens de taxonomia genômica foram aplicadas em todos os genomas deste estudo, utilizando o genoma *draft* da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 (número acesso no Genbank: ACGE01000000) e o genoma completo da estirpe clínica de *C. striatum* 216 (número acesso no Genbank: CP024932, isolada nos Estados Unidos) como modelos para delimitação dos genomas analisados para as seguintes abordagens: identidade média de nucleotídeos (ANI) (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>); identidade média de aminoácidos (AAI) (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>); assinatura genômica de Karlin (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/compseq>) e a hibridização DNA-DNA *in silico* (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>), utilizando o software *Genome-to-genome Distance Calculator*, GGDC 2.0 (<http://ggdc.dsmz.de>). Nestas abordagens foram utilizados os parâmetros padrões, com exceção da abordagem AAI, em que os valores de similaridades das sequências foram alterados para valores maiores que 40% para selecionar sequências codificantes, conforme descrito por Badotti e colaboradores (2014).

Nas análises de MLSA foram utilizadas as sequências de nucleotídeos de 7 genes constitutivos (*atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* e *rpoB*) usados na tipagem molecular (MLST) proposto por Bolt et al (2010) para a espécie *C. diphtheriae*, descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Genes constitutivos dos esquema de MLST de *C. diphtheriae* utilizados na construção da árvore filogenética nas análises de MLSA das estirpes de *C. striatum* deste estudo.

Genes	Tamanho (pb)	Proteína codificante	Referência
<i>atpA</i>	1640	Cadeia alfa da enzima ATP sintase	
<i>dnaE</i>	3560	Subunidade alfa da enzima DNA polimerase III	
<i>dnaK</i>	1845	Chaperona	
<i>fusA</i>	2130	Fator de alongamento G	Bolt et al, 2010.
<i>leuA</i>	1818	Enzima 2-isopropilmalato sintase	
<i>odhA</i>	3720	Componentes E1 e E2 da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase	
<i>rpoB</i>	3500	Subunidade beta da enzima RNA polimerase	

pb, pares de base; MLSA, Análise de Sequências de Múltiplos *loci*; MLST, *Multilocus Sequence Typing*.
Fonte: (adaptado de BOLT et al, 2010).

As sequências dos genes descritos anteriormente foram recuperadas dos genomas deste estudo e alinhadas utilizando o programa *CLUSTAL X* (THOMPSON et al, 1997). A árvore filogenética foi construída utilizando o programa *MEGA* versão 6.06 (TAMURA et al, 2013), o método selecionado foi o *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) e a distância inferida foi calculada usando o modelo de Kimura-2 parâmetros. A robustez das topologias foi realizada através da análise de *bootstrap* (1.000 réplicas).

3.6.2 Tipagem molecular por MLST

Os esquemas de MLST das espécies *C. diphtheriae* (BOLT et al, 2010) (**Tabela 5**), *C. macginleyi* (EGUCHI et al, 2008) e *C. striatum* (GOMILA et al, 2012) (**Tabela 6**) foram utilizados na construção das árvores filogenéticas, cujos resultados foram comparados com a tipagem molecular por PFGE, no intuito de observar qual dos dois apresenta maior poder discriminatório.

Tabela 6 - Genes constitutivos utilizados na construção das árvores filogenéticas nas análises de MLST, baseadas nos esquemas de MLST para as espécies *C. macginleyi* e *C. striatum*

Espécies	Genes	Tamanho (pb)	Proteína codificante	Referência
<i>C. macginleyi</i>	<i>adk</i>	546	Adenilato quinase	Eguchi et al, 2008.
	<i>aspA#</i>	1400	Fumarato hidratase	
	<i>dnaA</i>	1613	Proteína de iniciação da replicação	
	<i>gltA</i>	1296	Citrato sintase	
	<i>gyrB</i>	2052	Subunidade B da enzima girase	
	<i>Icd</i>	2172	Isocitrato desidrogenase	
	<i>purA</i>	1293	Adenylosuccinato sintase	
<i>C. striatum</i>	ITS*	~ 420	Região interespaçadora 16S – 23S	Gomila et al, 2012.
	<i>gyrA</i>	2570	Subunidade A da enzima girase	
	<i>rpoB</i>	3500	Subunidade beta da enzima RNA polimerase	

pb, pares de bases. # *aspA*, anteriormente denominado *fumC*; MLST, *Multilocus Sequence Typing*; * O ITS é uma região não-codificante entre os genes ribossomais 16S e 23S, de aproximadamente 420 pb.

Fonte: (adaptado de EGUCHI et al, 2008, GOMILA et al, 2012).

Os genes constitutivos foram recuperados nos genomas. As sequências foram alinhadas utilizando o programa *CLUSTAL X* (THOMPSON et al, 1997). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa *MEGA* versão 6.06 (TAMURA et al, 2013). O método selecionado foi o *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) e a distância inferida foi calculada usando o modelo de Kimura-2 parâmetros. A robustez das topologias foi realizada através da análise de *bootstrap* (1.000 réplicas).

3.6.3 Pesquisa dos genes de resistência nos genomas

Os genomas foram submetidos aos bancos de dados *Resfinder* (ZANKARI et al, 2012) e *ARG-Annot* (GUPTA et al, 2014) para a pesquisa por genes adquiridos através de transferência lateral e também foram pesquisadas mutações em genes associados à resistência. Além destes, os genomas foram submetidos ao algoritmo Blastp utilizando as sequências de proteínas disponíveis no banco de dados de referência de genes de resistência *Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database*, um projeto do NCBI (número de acesso: PRJNA313047).

Os genes obtidos a partir destas análises foram alinhados pelo programa *CLUSTAL X* (THOMPSON et al, 1997). As árvores filogenéticas foram construídas usando o programa *MEGA* versão 6.06 (TAMURA et al, 2013) e o método de *Neighbor-Joining*. A distância inferida foi calculada usando o método de Kimura-2 parâmetros e *bootstrap* de 1000 réplicas.

3.6.4 Pesquisa do mobiloma

Os seguintes componentes do mobiloma foram buscados: integrons, SI, plasmídeos, ilhas genômicas de resistência, fagos e CRISPR.

Para determinar a composição dos cassetes gênicos associados aos integrons, foram utilizados os bancos de dados INTEGRALL (MOURA et al, 2009) e RAC (*Repository of Antibiotic resistance Cassettes*) (TSAFNAT; COPTY; PARTRIDGE, 2011).

Para a busca de SI foi utilizado o banco de dados *ISfinder* (SIGUIER et al, 2006) e o algoritmo local (*Blastx*) foi o escolhido. Foram consideradas todas as sequências com alinhamentos com a melhor pontuação (*score*) e E-value igual a zero, o que significa um menor número de chances de as sequências serem alinhadas aleatoriamente com outras e, portanto, o resultado é mais significativo (JUNQUEIRA; BRAUN; VERLI, 2014).

A busca por plasmídeos foi feita utilizando o banco de dados *PlasmidFinder* (CARATTOLI et al, 2014) e também por alinhamento local usando os algoritmos *Blastn* e *Blastx* no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor Editor v. 7.2.5* (HALL, 1999), com limite (*threshold*) mínimo de busca de 30%.

A análise de ilhas genômicas foi realizada utilizando o programa *GIPSY* (SOARES et al, 2016) para as 10 estirpes de interesse. Nesta análise, utiliza-se o arquivo gbk da estirpe e o arquivo gbk de uma linhagem próxima, porém não patogênica, que serve como referência para a análise. Neste caso, utilizamos o genoma de *C. striatum* Kc-Na-01, único genoma completo da espécie não-patogênica. Neste *software* é possível prever ilhas de resistência - alvos deste estudo - e ilhas simbióticas e metabólicas. As ilhas genômicas são previstas através de oito passos que identificam as seguintes características: desvio de assinatura genômica (conteúdo GC e uso de códons); presença de fatores de virulência, metabolismo e resistência a antibióticos e simbiose; genes de tRNA flanqueadores; presença de genes codificadores de transposases e ausência das regiões identificadas como ilhas genômicas na linhagem de referência.

A busca por fagos foi feita utilizando o programa *PHASTER* (*PHast Search Tool Enhanced Release*) (<http://phaster.ca/>) (ARNDT et al, 2016). Os resultados foram gerados em

forma de tabela com detalhes das predições contendo figuras com as características e localização das regiões preditas.

Para a pesquisa dos elementos CRISPR foi utilizado o banco de dados *CRISPRdb* (GRISSA; VERGNAUD; POURCEL, 2007), através da ferramenta *CRISPRfinder* da Université Paris- SUD11 (<http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php?page=Help>). Os genomas bacterianos foram submetidos e tabelas com identificação das regiões repetitivas e dos espaçadores de CRISPR foram disponibilizadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pesquisa dos genes de resistência e da integrase por PCR

Inicialmente, amplificamos os genes *aphA*, *ermX*, *cmx* e *intI* na estirpe 2425. Os amplicons de cada gene foram purificados, sequenciados, analisados e utilizados como controles-positivos para as PCR das demais estirpes de *C. striatum* (N=20). Assim, verificamos a ausência (-) ou a presença (+) dos genes de resistência conforme mostrado na **Tabela 7**. Em 20 estirpes foram amplificados os genes *aphA*, *ermX* e *cmx*, relacionados à resistência aos aminoglicosídeos, macrolídeos/lincosamidas e cloranfenicol, respectivamente. Nenhum gene foi amplificado na estirpe 2376, isolada de neonato.

Tabela 7 - Pesquisa dos genes de resistência e integrase por PCR.

Estirpes	<i>aphA</i>	<i>ermX</i>	<i>cmx</i>	<i>tetAB</i>	<i>repB</i>	<i>intI</i>
2089	+	+	+	-	-	-
2091	+	+	+	-	-	-
2103	+	+	+	-	-	-
2130	+	+	+	-	-	+
2228	+	+	+	-	-	-
2230	+	+	+	-	-	-
2237	+	+	+	-	-	-
2243	+	+	+	-	-	-
2245	+	+	+	-	-	-
2285	+	+	+	-	-	-
2296	+	+	+	-	-	+
2308	+	+	+	-	-	-
2316	+	+	+	-	-	-
2324	+	+	+	-	-	-
2376	-	-	-	-	-	-
2390	+	+	+	-	-	-
2401	+	+	+	-	-	-
2425	+	+	+	-	-	+
2432	+	+	+	-	-	-
2439	+	+	+	-	-	-
2454	+	+	+	-	-	-
Total positivos	20	20	20	0	0	3

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase; + = gene amplificado (presença); - gene não amplificado (ausência); *aphA*: resistência aos aminoglicosídeos; *ermX*: resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B; *cmx*: resistência ao cloranfenicol; *tetA*: resistência às tetraciclinas; *repB*: replicon de plasmídeo; *intI*: integrase classe I.

Fonte: (Da autora, 2018).

Todas as estirpes *ermX*-positivas foram resistentes à eritromicina e à clindamicina, pelo método de disco-difusão realizado (**ANEXO A**). Todas as estirpes *cmx*-positivas foram resistentes ao cloranfenicol. Duas estirpes *aphA*-positivas (2130 e 2425) foram sensíveis à gentamicina e isto será discutido na sessão sobre a “Resistência aos aminoglicosídeos”. A única estirpe (2376) que não amplificou os genes *ermX*, *aphA* e *cmx* foi também a única sensível à clindamicina e à eritromicina, à gentamicina e ao cloranfenicol, respectivamente, pelo método de disco-difusão (**ANEXO A**).

Os genes *tetAB* e *repB*, envolvidos na resistência à tetraciclina e na maquinaria de replicação de plasmídeo, respectivamente, não foram amplificados em nenhuma estirpe.

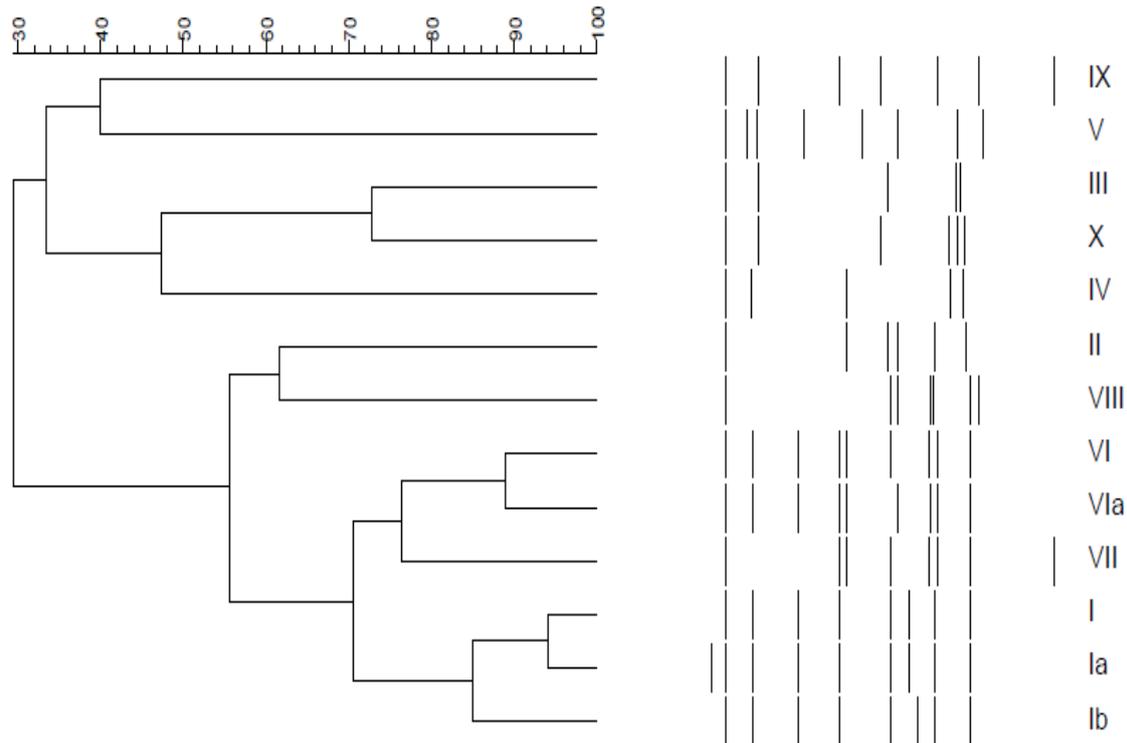
O gene da integrase I foi encontrado em apenas três estirpes (2130, 2296 e 2425). Os amplicons foram purificados e sequenciados. Os tamanhos das sequências variaram entre 349-422 pb (pares de bases). As sequências editadas foram submetidas ao Genbank utilizando o algoritmo *Blastn* e as similaridades encontradas foram superiores a 98,5% para o integron classe I de *Acinetobacter baumannii* (Genbank nº KJ131499). As estirpes com perfil A de resistência (sensível apenas à tetraciclina, à linezolida e à vancomicina) foram negativas para a pesquisa do gene da integrase I por PCR.

O gene constitutivo *gyrA* foi amplificado e sequenciado para as 21 estirpes. As sequências nucleotídicas foram traduzidas em aminoácidos e as mutações nas posições 87 e 91 da região QRDR deste gene, relacionadas à resistência às quinolonas, foram analisadas e mostradas na **Tabela 14**, na seção “Resistência às Quinolonas”.

4.2 PFGE

O DNA clivado pela enzima de restrição *SwaI* das 21 estirpes de *C. striatum* revelou a presença de 11 pulsotipos distintos, designados como I, Ia, Ib, II, V, VI, VIa, VII, VIII, IX e X (**Figura 3**). O pulsotipo I foi o mais frequentemente observado (n=10), sendo quatro isolados de sangue e seis de cateter. Os pulsotipos I, Ia e Ib tiveram coeficiente de similaridade $\geq 85\%$ e foram considerados geneticamente relacionados. Os pulsotipos VI e VIa mostraram coeficientes de similaridade $\geq 90\%$ e também foram considerados geneticamente relacionados. Os pulsotipos III e IV isolados no surto nosocomial no HUPE/UERJ (BAIO et al, 2013) não foram encontrados no período de isolamento das estirpes deste trabalho.

Figura 3 - Dendrograma gerado pelas análises DICE/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis de PFGE das estirpes de *C. striatum* isoladas de sítios intravenosos. Os pulsotipos III e IV anteriormente descritos (BAIO et al, 2013) não foram encontrados em pacientes com infecções de sangue e cateter.



Relação das estirpes quanto aos pulsotipos: I) 2089, 2091, 2243, 2245, 2285, 2308, 2316, 2324, 2439 e 2454; II) 2401; V) 2130; VI) 2228, 2230, 2237 e 2390; VII) 2296; VIII) 2103; IX) 2425 e 2432; X) 2376.
Fonte: (Da autora, 2018).

A investigação do relacionamento das estirpes realizadas neste estudo revelou a permanência do pulsotipo I no ambiente hospitalar como clones invasivos. Em adição, novos pulsotipos emergiram como agentes etiológicos de infecções da corrente sanguínea e relacionados ao cateter.

4.3 Sequenciamento genômico de alta vazão

De acordo com os pulsotipos obtidos e a presença de integrase, cinco estirpes foram selecionadas para o sequenciamento genômico de alta vazão na plataforma Illumina do IOC/Fiocruz: 2130, 2237, 2296, 2308 e 2425. Outras cinco estirpes de *C. striatum*, uma deste trabalho (2230) e outras quatro relatadas no surto epidêmico de 2009 (BAIO et al, 2013), foram sequenciadas pela plataforma Ion Torrent (UFBA/UFMG/UFPA).

Os dados sobre o sítio e data de isolamento, pulsotipo e perfil de suscetibilidade das estirpes que foram selecionadas para o sequenciamento de alta vazão são apresentados na **Tabela 8**. As estirpes 2230 e 2237 foram isoladas de sangue, do mesmo paciente, com 1 mês de diferença no isolamento.

Tabela 8 - Dados das estirpes de *C. striatum* isoladas no surto ocorrido no Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Estirpes	Mês e ano de isolamento	Sítio de isolamento	Pulsotipo	Perfil de suscetibilidade	Plataforma	Nº de acesso no Genbank
1954*	Outubro/2009	Secreção de ferida cirúrgica	IV	G	Ion Torrent	PGGF00000000
1961*	Dezembro/2009	Urina	III	G	Ion Torrent	LAYR01000000
2023*	Agosto/2009	Sangue	I	A	Ion Torrent	LBCN01000000
2038*	Setembro/2009	Sangue	II	A	Ion Torrent	PGGG00000000
2130	Agosto/2010	Sangue	V	D	Illumina	NRIL01000000
2230	Fevereiro/2011	Sangue	VI	B	Ion Torrent	LTBF01000000
2237	Março/2011	Sangue	VI	B	Illumina	NRIM01000000
2296	Julho/2011	Cateter venoso central	VII	C	Illumina	NRIN01000000
2308	Agosto/2011	Sangue	I	A	Illumina	NRIO00000000
2425	Agosto/2012	Sangue	IX	E	Illumina	NRIP01000000

* Dados oriundos do artigo publicado por Baio et al, 2013; Nº, número. Fonte: (Da autora, 2018).

4.3.1 Métricas do sequenciamento e anotação dos genomas

Algumas medidas são muito importantes para avaliar a qualidade da montagem dos genomas, tais como o N50, cobertura do sequenciamento, tamanho do maior *contig* e o número de *contigs* montados. Para avaliar a qualidade das montagens e comparar os genomas montados, utilizamos a ferramenta *online Quality Assessment Tool for Genome Assemblies (QUAST)* (GUREVICH et al, 2013).

O tamanho dos genomas variou de 2.611,976 – 3.125,333 pb, conforme apresentado na **Tabela 9**. As estirpes 2296 e 2308 tiveram as melhores coberturas de sequenciamento (375x e 254x, respectivamente), que corresponde em média, quantas vezes cada base do genoma foi sequenciada. Entretanto, ambas não apresentaram as melhores montagens. Apesar de não ter tido a melhor cobertura do sequenciamento (109x), a melhor montagem foi a da

estirpe 1954, com 14 *contigs*, o maior *contig* montado com 1.478,048 pb, o mesmo valor de N50, o que significa que 50% do total de pares de bases do genoma estão em *contigs* de 1.478,048 pb ou maiores. O N50 é obtido ordenando-se os *contigs* em ordem de tamanho, do maior para o menor, e este corresponde ao *contig* no qual se atingiu pelo menos 50% do tamanho total do genoma. O conteúdo GC dos genomas variou de 59,3% a 59,5%, sendo a média para *C. striatum* de 59,3%, baseada em 18 genomas depositados no NCBI.

A anotação dos genomas identificou de 2.033 a 2.751 sequências codificantes (CDS) e o número de RNAs variou, mesmo entre as estirpes do mesmo pulsotipo e do mesmo paciente (2230 e 2237). A estirpe 2237 apresentou uma diferença de 226.451 pares de bases a mais que o primeiro isolado (2230), com diferença de apenas 1 mês de isolamento.

Antes da execução de todas as análises descritas a partir do item 5.4, submetemos os genomas montados aos programas *ACDC* e *ContEst16S* para pesquisa de contaminantes. Nenhum contaminante ou fragmento exógeno do gene 16S rRNA foi localizado em nossos genomas.

Tabela 9 - Métricas dos sequenciamentos realizados nas plataformas Illumina Hiseq 2500 e Ion Torrent

Estirpes	Tamanho genoma (pb)	Nº de <i>contigs</i>	Maior <i>contig</i>	N50	Nº de CDS	Nº de RNA	Conteúdo GC (%)	Cobertura Sequenciamento
1954	2.840,792	14	1.478,048	1.478,048	2.409	75	59.3	109x
1961	2.611,976	28	532.574	325.912	2.033	69	59.4	145x
2023	2.735,401	73	261.577	92.628	2.561	57	59.4	55x
2038	2.841,405	20	481.681	368.593	2.306	68	59.3	170x
2130	3.043,960	48	402.930	150.421	2.725	72	59.4	148x
2230	2.898,882	37	463.238	176.095	2.498	65	59.4	193x
2237	3.125,333	59	384.043	182.859	2.751	78	59.4	119x
2296	2.855,971	52	293.378	192.774	2.524	66	59.4	375x
2308	2.998,548	57	551.156	142.041	2.623	84	59.3	254x
2425	2.847,122	46	534.446	218.228	2.537	65	59.4	147x

pb, pares de base; CDS, sequências codificantes; RNA, ácido ribonucleico; GC, guanina-citosina.

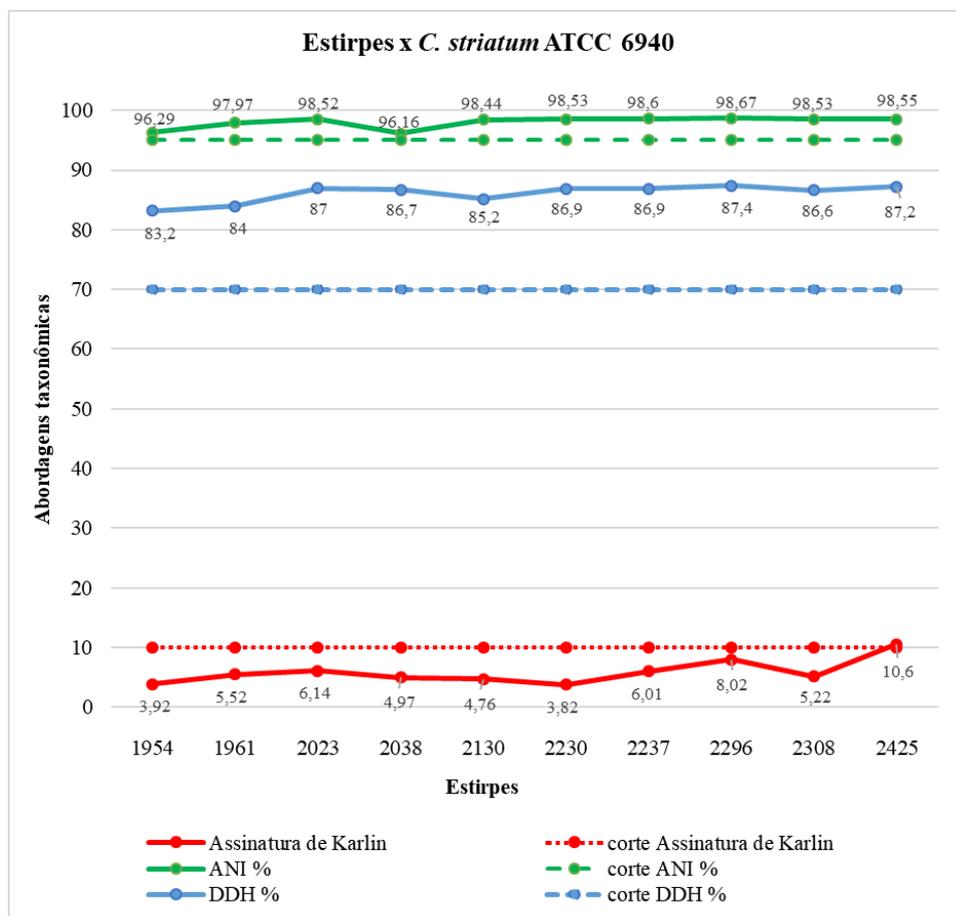
Fonte: (Da autora, 2018).

4.4 Taxonomia genômica

Antes de submetermos os genomas aos bancos de dados para pesquisa de genes de resistência e mobiloma (para a caracterização genética da resistência), foi realizada uma ampla abordagem de taxonomia genômica, com o objetivo de se verificar se todas as estirpes eram pertencentes à espécie *C. striatum*, já que ocorreu a formação de dois clados na árvore filogenética do gene *rpoB* (**Figura 27**). Utilizamos as seguintes abordagens taxonômicas: ANI; AAI; assinatura genômica de Karlin, DDH *in silico* e MLSA, descritas anteriormente.

Os resultados encontrados para a abordagem ANI, que estima a identidade média de nucleotídeos entre dois genomas da mesma espécie (valor superior a 95%), são mostrados no **Gráfico 1**.

Gráfico 1 – Abordagens taxonômicas empregadas para avaliar a relação das estirpes clínicas de *C. striatum* utilizando o genoma *draft* da cepa tipo como modelo delineador.



Fonte: (Da autora, 2018).

Todos os genomas apresentaram valores superiores a 95%, variando de 96,29 a 98,67% (**Gráfico 1**). Na DDH *in silico*, que vem sendo aplicada para obter uma estimativa da semelhança global entre os genomas de dois organismos, na qual as estirpes que apresentam valor acima de 70% são consideradas da mesma espécie, todos os genomas deste estudo apresentaram valores superiores a 80% (83,2-87,4%). Os valores de ANI e a DDH *in silico* têm sido os mais utilizados na taxonomia genômica para a descrição de novas espécies bacterianas, embora apenas estas abordagens não tenham sido utilizadas para a descrição de novas espécies. Os valores de ANI e DDH encontrados para todos os genomas corroboram a espécie *C. striatum* utilizada neste estudo.

A assinatura genômica de Karlin, que calcula a frequência de mononucleotídeos e dinucleotídeos, que deve ser semelhante entre espécies intimamente relacionadas (valores abaixo de 10), foi a única abordagem que apresentou resultado um pouco acima do limite (10,6) para a estirpe 2425. Como não é um valor muito discrepante do limiar e as demais abordagens apresentaram valores dentro dos limites, principalmente ANI e DDH, esta alteração na assinatura genômica de Karlin não foi levada em consideração. Mais adiante, é possível observar nas análises de MLSA, o clado único formado pela cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 e por todas as estirpes do estudo, incluindo a estirpe 2425, corroborando a espécie *C. striatum*.

Os valores encontrados para a abordagem AAI, que estima a identidade média de aminoácidos (valor acima de 95% entre dois genomas da mesma espécie) são mostrados na **Tabela 10**. Todos os valores de AAI foram superiores a 97%, sugerindo que todas as estirpes aqui estudadas pertencem à espécie *C. striatum*.

Tabela 10 - Resultados das análises de AAI das estirpes de *C. striatum* utilizando a cepa tipo ATCC 6940 como referência.

Estirpes	1954	1961	2023	2038	2130	2230	2237	2296	2308	2425
AAI (%) (≥ 95%)	97,63	97,88	98,16	98,32	98,12	98,27	98,32	98,31	98,41	97,97

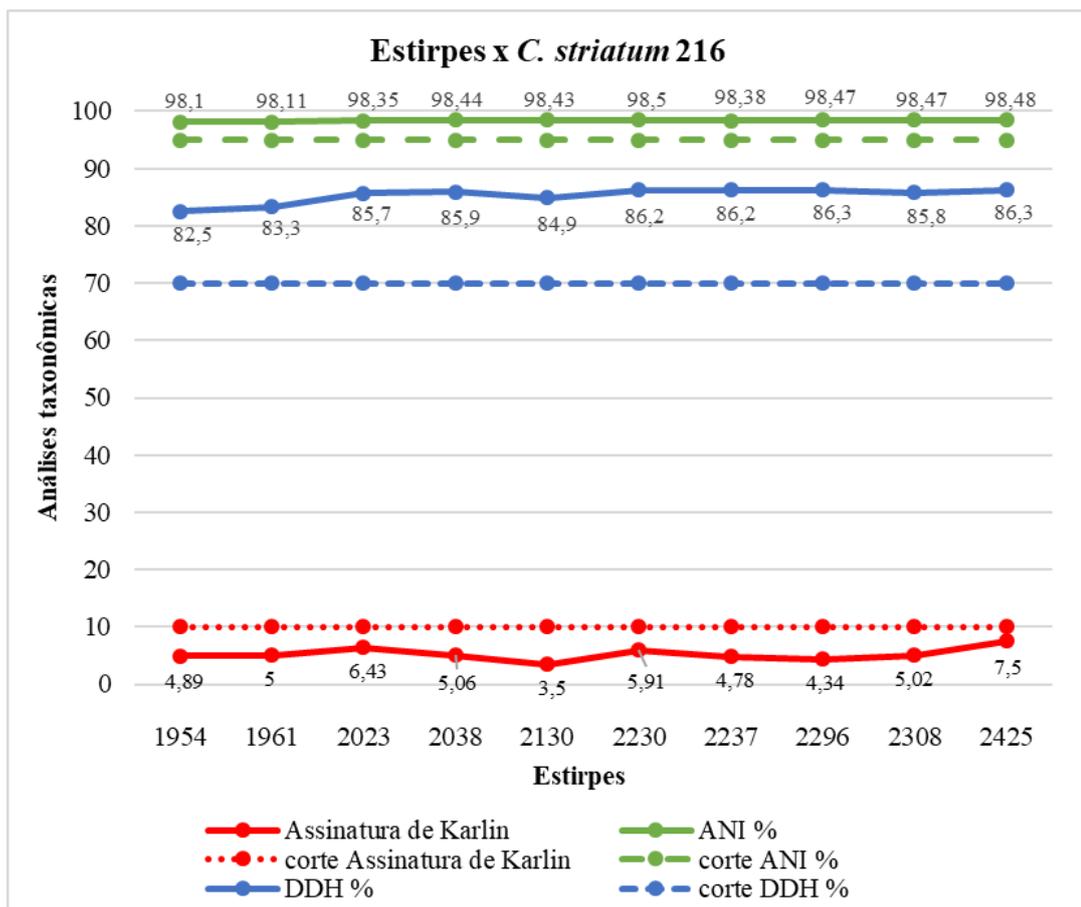
AAI, identidade média de aminoácidos.

Fonte: (Da autora, 2018).

Posteriormente, o genoma completo da estirpe clínica multirresistente de *C. striatum* 216 (Genbank nº NZ_CP024932) isolada nos Estados Unidos, foi utilizado como modelo para delimitação dos genomas analisados, para verificar possíveis discrepâncias nos valores em comparação com o genoma da cepa tipo por se tratar de um rascunho (*draft*). Mas antes, esta

estirpe foi também avaliada em todas as abordagens taxonômicas descritas anteriormente. O **Gráfico 2** apresenta todos os resultados dentro dos valores esperados: ANI acima de 95%; DDH *in silico* acima de 70% e assinatura genômica de Karlin abaixo de 10. Neste caso, a estirpe 2425 apresentou valor abaixo de 10 para a assinatura de Karlin, embora tenha sido o valor mais alto encontrado.

Gráfico 2 - Abordagens taxonômicas empregadas para avaliar a relação das estirpes clínicas de *C. striatum* utilizando o genoma completo da estirpe de *C. striatum* 216 como modelo lineador.



Fonte: (Da autora, 2018).

Os valores de AAI são mostrados na **Tabela 11**, sugerindo que as nossas estirpes compartilham valores acima de 97% de similaridade com o genoma completo da estirpe clínica de *C. striatum* 216 e que são da mesma espécie (*C. striatum*).

Tabela 11 - Resultados das análises de AAI das estirpes de *C. striatum* utilizando o genoma completo da estirpe clínica 216 isolada nos Estados Unidos

Estirpes	1954	1961	2023	2038	2130	2230	2237	2296	2308	2425
AAI (%) (≥ 95%)	97,61	97,92	97,77	97,96	97,75	98,01	98,01	97,80	98,07	97,77

AAI, identidade média de aminoácidos.

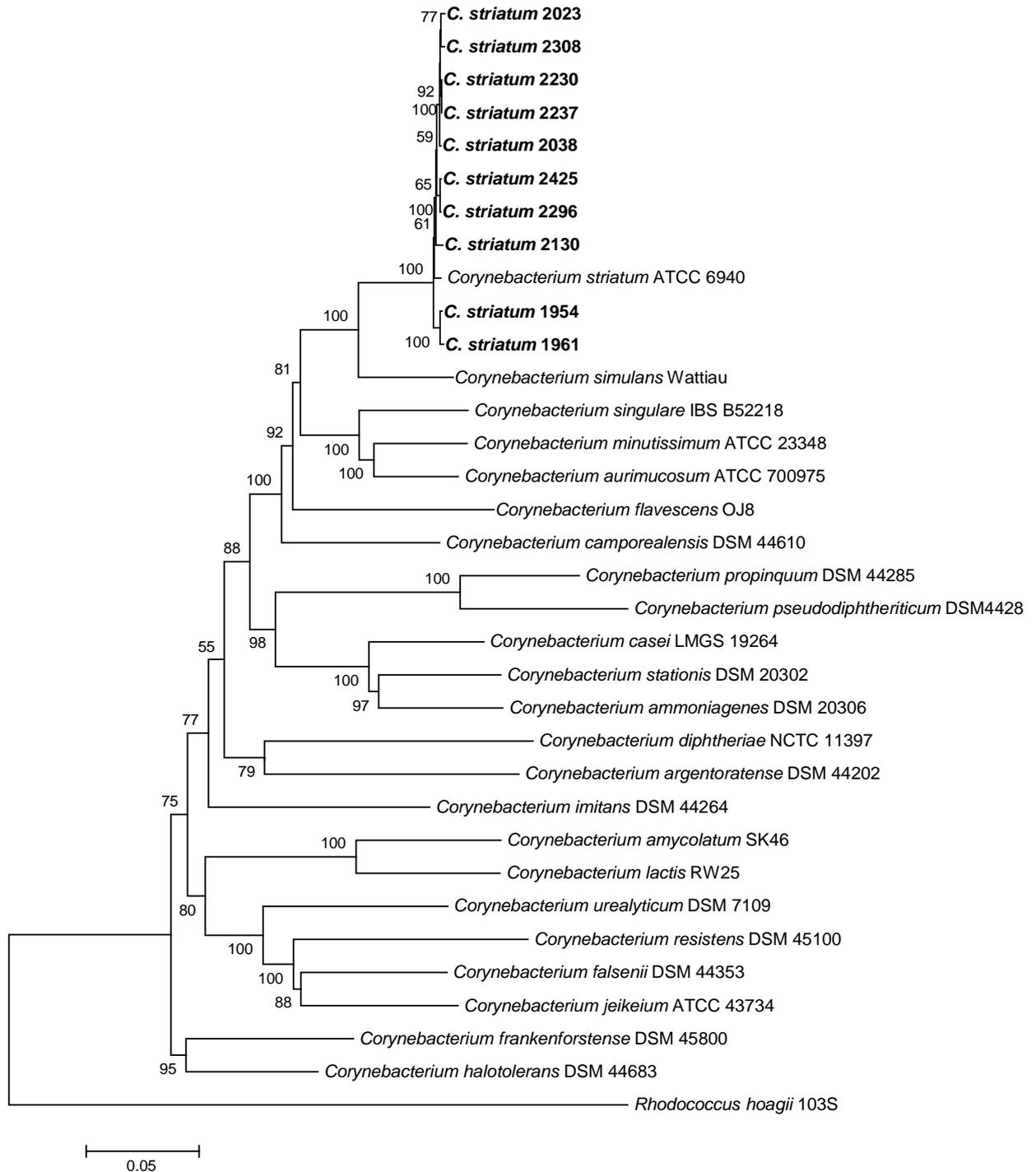
Fonte: (Da autora, 2018).

A árvore filogenética de MLSA (**Figura 4**) utilizando os genes constitutivos do esquema de MLST de *C. diphtheriae* (**Tabela 5**) foi construída usando o programa MEGA 6 e o método de Neighbor-Joining. A distância inferida foi calculada usando o método de Kimura-2 parâmetros e *bootstrap* de 1000 réplicas.

A árvore de MLSA (**Figura 4**) é baseada no esquema de tipagem molecular por MLST para *C. diphtheriae* (BOLT et al, 2010), a única espécie representante do gênero com banco de dados público, permitindo a comparação com estirpes do bacilo diftérico isoladas do mundo inteiro. Um total de 15.802 posições foram usadas na construção da árvore concatenada e a espécie *Rhodococcus hoagii*, anteriormente conhecida como *Rhodococcus equi*, foi utilizada como grupo de fora. É possível observar que apesar da diversidade entre as nossas estirpes, destacadas em negrito, todas agrupam-se num único clado com a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940, com destaque para as estirpes multissensíveis 1954 e 1961, que se agrupam mais distantes das restantes que são multirresistentes.

Diante de todos os resultados de análises taxonômicas apresentados anteriormente, podemos concluir também que nesta análise as nossas estirpes pertencem à espécie *C. striatum*.

Figura 4 - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 7 genes constitutivos (15.802 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. diphtheriae*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,05% de divergência. Em destaque (negrito) as estirpes deste estudo. Os genes constitutivos *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* e *rpoB* foram utilizados na construção desta árvore filogenética. Apenas as espécies *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. simulans* e *R. hoagii* utilizadas nesta árvore não são cepas tipo



Fonte: (Da autora, 2018).

4.5 Tipagem molecular por mlst x tipagem molecular por PFGE

Aproveitando as análises filogenéticas baseadas no esquema de MLST de *C. diphtheriae* apresentadas na **Figura 4**, cujo objetivo anterior era a caracterização e identificação das nossas estirpes, decidimos avaliar o poder discriminatório deste esquema de MLST para tipagem de nossas estirpes e comparar com os resultados de tipagem molecular por PFGE, descritos no item 5.2.

Avaliamos também outros dois esquemas de MLST propostos para as espécies *C. striatum* (GOMILA et al, 2012) e *C. macingleyi* (EGUCHI et al, 2008), que são melhor detalhados a seguir, mas que não possuem banco de dados públicos.

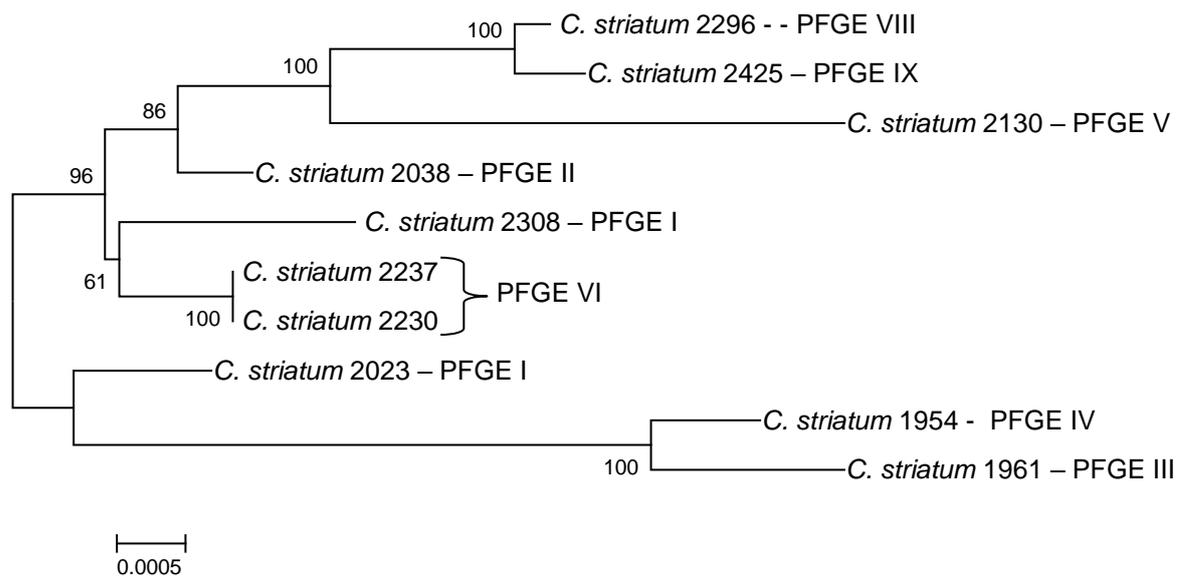
Nos três esquemas de MLST utilizados para a construção das árvores filogenéticas, foram usadas as sequências completas dos genes constitutivos e da região ITS (região espaçadora entre os genes ribossomais 16S e 23S), descritos nas **Tabelas 5 e 6**. Em cada esquema, foram construídas três árvores: a) apenas as estirpes de *C. striatum* deste estudo; b) estirpes de *C. striatum* deste estudo e de outros países, depositadas no NCBI, permitindo-nos comparar com as sequências destas estirpes, e c) as sequências de *C. striatum* deste estudo, de outros países e *C. simulans* como grupo de fora.

4.5.1 Esquema de MLST de *C. diphtheriae*

Existem apenas 18 genomas de *C. striatum* disponíveis no NCBI até o momento. Para a construção das árvores, utilizamos o genoma completo da estirpe *C. striatum* Kc-Na-01 (Genbank nº CP021252), isolada do cetáceo *Neophocaena asiaeorientalis* na Coreia do Sul, também conhecido como Boto-do-Índico, que foi o primeiro genoma completo de *C. striatum* depositado no banco de dados (em maio de 2017). Existem apenas outros dois genomas completos de *C. striatum*. Tratam-se das estirpes clínicas multirresistentes 215 e 216 (Genbank nº CP024931 e CP024932, respectivamente) coletadas nos Estados Unidos. Utilizamos também, os genomas *draft* de quatro estirpes do microbioma humano coletadas nos Estados Unidos: 542-CAUR (Genbank nº JVCW01000001); 587-CAUR (Genbank nº JVBA01000001); 963-CAUR (Genbank nº JULV01000001) e 1327-CAUR (Genbank nº JVTN01000001). O genoma *draft* da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 (Genbank nº ACGE01000001) também foi utilizado. Foram construídas as árvores filogenéticas representadas nas **Figuras 5a, 5b e 5c**, usando apenas as estirpes de *C. striatum* deste estudo;

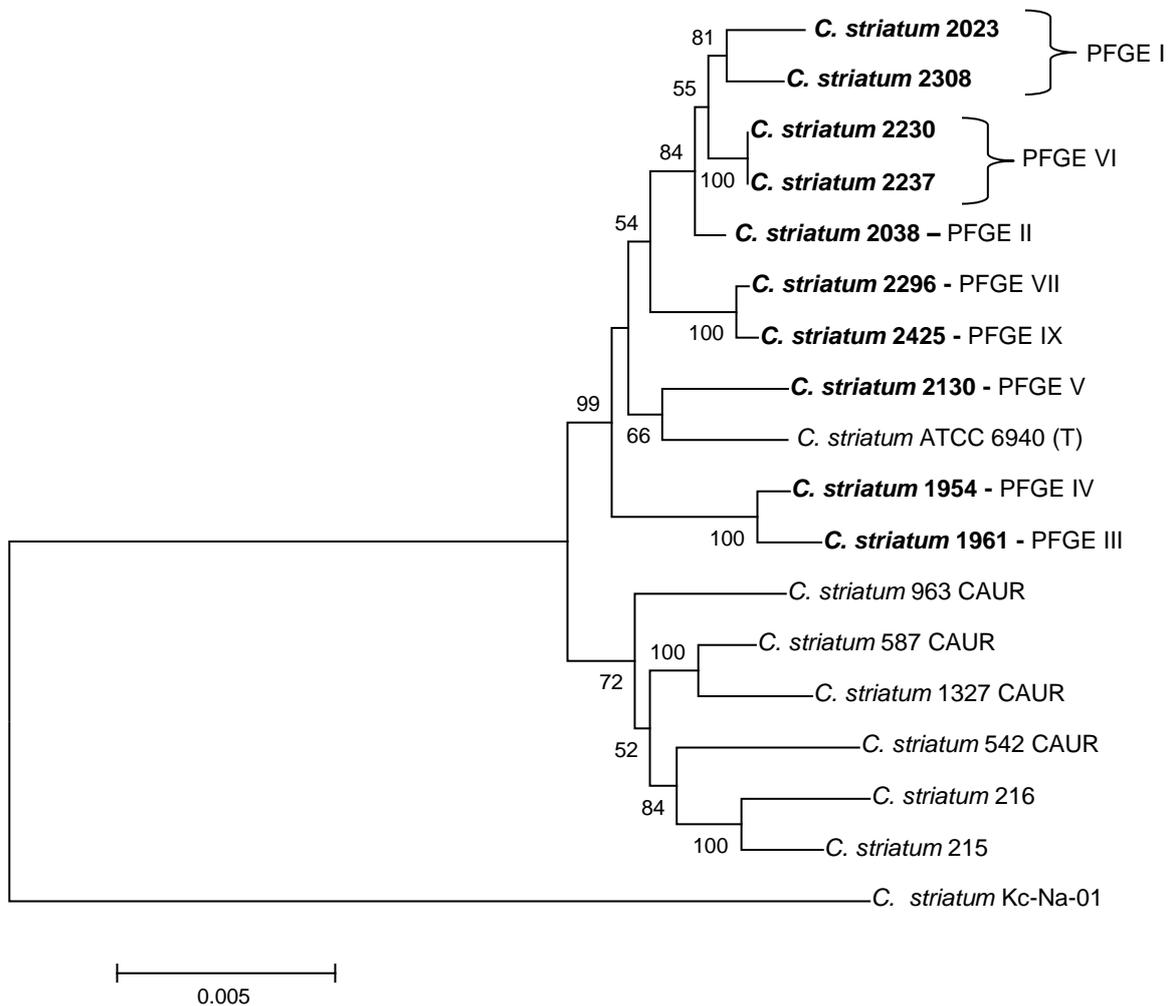
com estirpes de *C. striatum* de outros países e utilizando *C. simulans* como grupo de fora, respectivamente, que é a espécie filogeneticamente mais próxima de *C. striatum*.

Figura 5a - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 7 genes constitutivos (18.171 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. diphtheriae*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,0005% de divergência. As sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* e *rpoB* apenas das estirpes deste estudo foram utilizadas na construção desta árvore filogenética usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulstotipo designado pelas análises de PFGE.



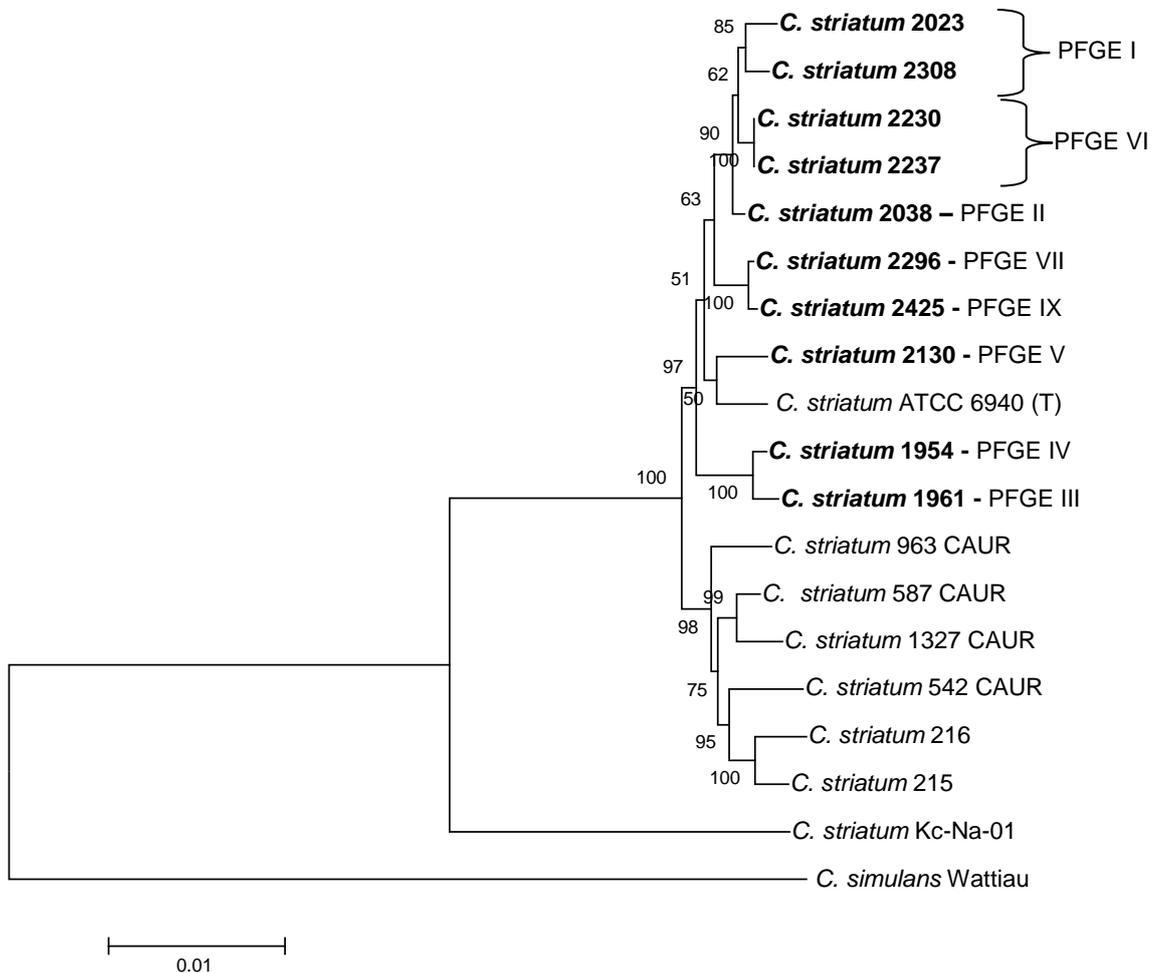
Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 5b - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 7 genes constitutivos (18.105 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. diphtheriae*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,005% de divergência. (T) cepa tipo. Em destaque (negrito) as estirpes deste estudo. As sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* e *rpoB* das estirpes de *C. striatum* deste estudo e de outros países foram utilizadas na construção desta árvore filogenética usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulsotipo designado pelas análises de PFGE.



Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 5c - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 7 genes constitutivos (18.105 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. diphtheriae*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,01% de divergência. (T) cepa tipo. Em destaque (negrito) as estirpes deste estudo. Para a construção desta árvore filogenética, foram utilizadas as sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* e *rpoB* das estirpes de *C. striatum* deste estudo, de outros países e de *C. simulans* como grupo de fora, usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulstotipo designado pelas análises de PFGE.



Fonte: (Da autora, 2018).

Nas árvores filogenéticas acima, podemos observar que as estirpes 2230 e 2237, do mesmo paciente e pulstotipo, foram agrupadas com 100% de similaridade, portanto, seriam classificadas no mesmo ST. Já as estirpes 2023 e 2308, classificadas pelo PFGE como pertencentes ao pulstotipo I não seriam agrupadas no mesmo ST. As demais estirpes apresentaram variabilidade tanto pelo PFGE e pelo MLST.

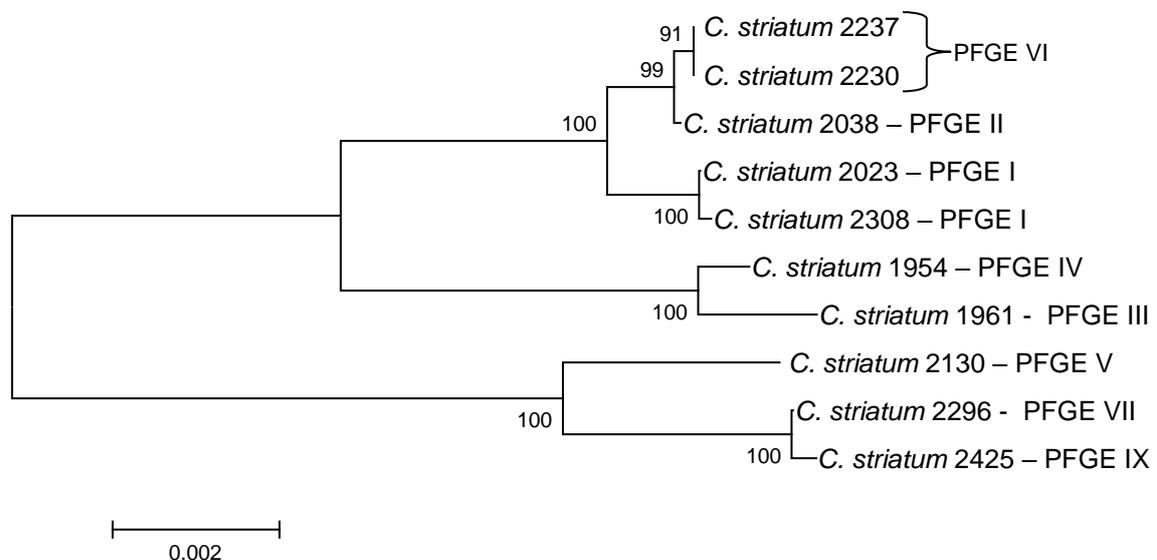
Na **Figura 5b**, observamos que as estirpes deste estudo e a cepa tipo ATCC 6940 formam um clado único; as estirpes isoladas nos Estados Unidos também se agrupam em um

único clado e a estirpe isolada de animal (Kc-Na-01) agrupa-se distante de ambos os clados, como um grupo de fora.

4.5.2 Esquema de MLST de *C. striatum*

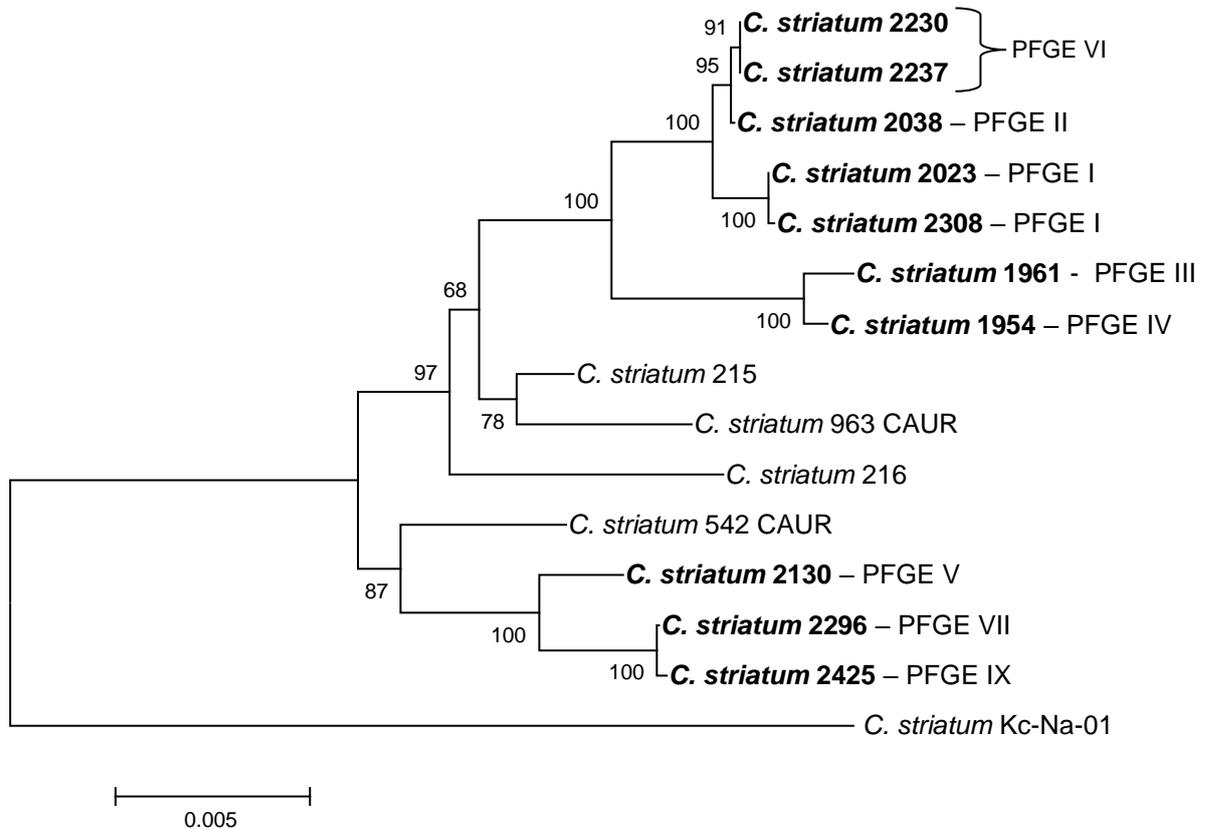
Gomila et al (2012) descreveram o desenvolvimento de um esquema de MLST para *C. striatum*. A região ITS e os genes *gyrA* e *rpoB* foram escolhidos como genes apropriados para discriminar *C. striatum* isolado de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica dos hospitais da Espanha. Utilizando este esquema, foram construídas as árvores filogenéticas representadas nas **Figuras 6a, 6b e 6c**, usando apenas as estirpes de *C. striatum* deste estudo; com estirpes de *C. striatum* de outros países e utilizando *C. simulans* como grupo de fora, respectivamente.

Figura 6a - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 2 genes constitutivos e região espaçadora ITS (6.399 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. striatum*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,002% de divergência. As sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *rpoB*, *gyrA* e da região ITS das estirpes deste estudo foram utilizados na construção desta árvore filogenética usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulsotipo designado pelas análises de PFGE.



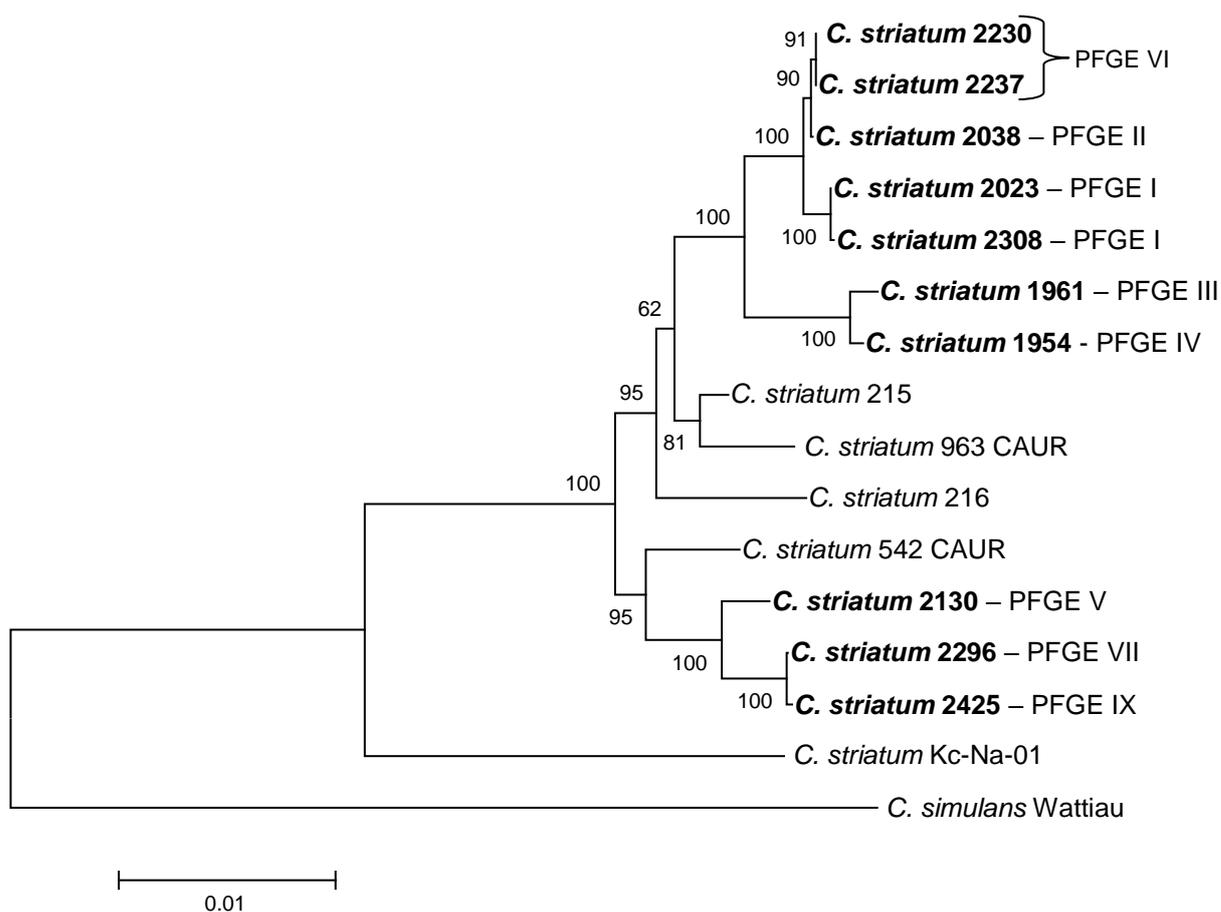
Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 6b - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 2 genes constitutivos e região espaçadora ITS (6.389 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. striatum*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,005% de divergência. Em destaque (negrito) as estirpes deste estudo. As sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *rpoB*, *gyrA* e da região ITS das estirpes de *C. striatum* deste estudo e de outros países foram utilizadas na construção desta árvore filogenética usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulstotipo designado pelas análises de PFGE.



Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 6c - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 2 genes constitutivos e região espaçadora ITS (6.377 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. striatum*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,01% de divergência. Em destaque (negrito) as estirpes deste estudo. Para a construção desta árvore filogenética foram utilizadas as sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *rpoB*, *gyrA* e da região ITS das estirpes de *C. striatum* deste estudo, de outros países e de *C. simulans* como grupo de fora, usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulsotipo designado pelas análises de PFGE.



Fonte: (Da autora, 2018).

Nas árvores filogenéticas acima, apesar de apenas 2 genes constitutivos (*gyrA* e *rpoB*) e a região espaçadora ITS terem sido utilizados na construção deste esquema de MLST, nota-se que na **Figura 6a**, onde foram utilizadas apenas as estirpes de *C. striatum* deste estudo, nota-se que as diferenças entre as estirpes 2023 e 2308, ambas do pulsotipo I, foram evidenciadas, embora mais discretas. Assim, seriam classificadas em ST diferentes. Já as estirpes do pulsotipo VI, 2230 e 2237, foram agrupadas como pertencentes ao mesmo ST. As

demais estirpes apresentaram variabilidade pelo PFGE e MLST, nas três análises filogenéticas acima (**Figura 6a, 6b e 6c**).

Não foi possível usar a região ITS dos genomas 587-CAUR e 1327-CAUR, isolados do microbioma humano nos Estados Unidos, devido aos tamanhos pequenos recuperados (menores que 180 pb). Nos demais genomas, essa região apresentou tamanho de 420 pb, em média. Não foi possível recuperar a região ITS da cepa tipo ATCC 6940, pois entre os genes ribossomais 16S e 23S há uma proteína de elemento móvel inserida (destacada em rosa na **Figura 7**), com 100% de similaridade com a transposase da família IS21 de *C. striatum* (Genbank nº WP_005532215), com domínio de integrase encontrada em fagos.

Figura 7 – Região do operon ribossomal mostrando o elemento móvel viral destacado em rosa entre os genes ribossomais 16S e 23S (destacados em verde). Visualização da região genômica obtida no programa Artemis, versão 17.0.1 (CARTER et al, 2012)



Fonte: (Da autora, 2018).

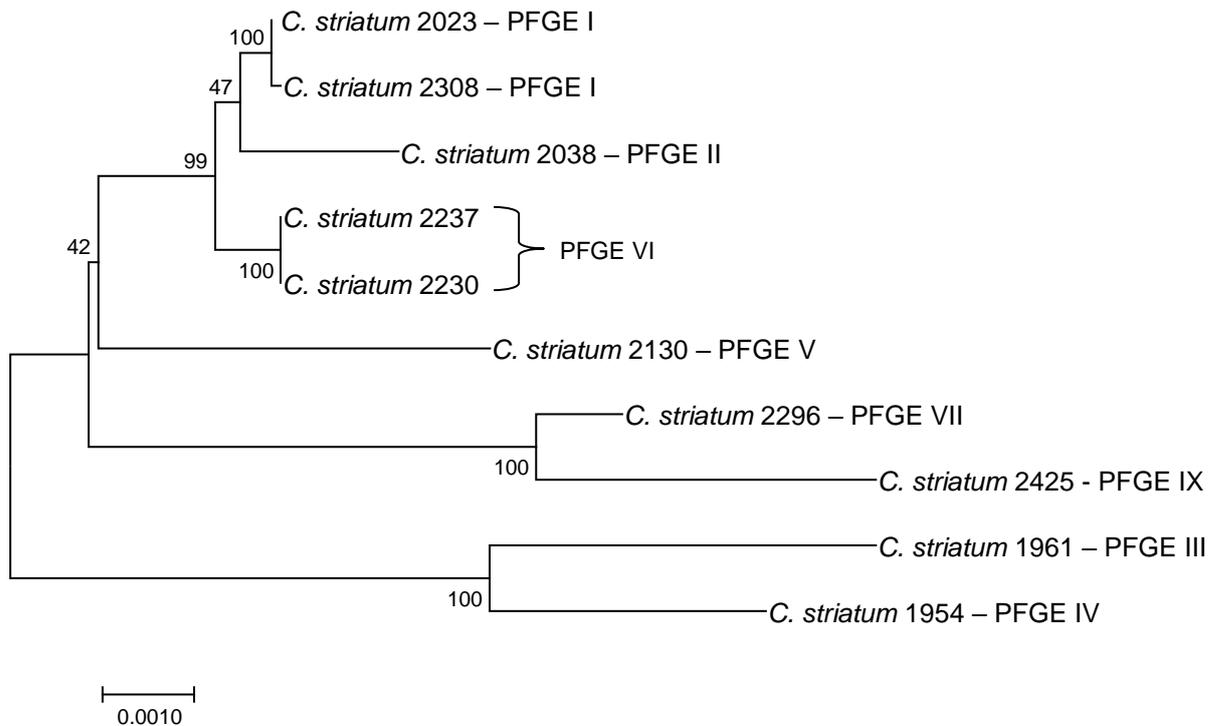
Na **Figura 6b**, as nossas estirpes não se agrupam num clado único, se agrupam com as estirpes dos Estados Unidos. A estirpe Kc-Na-01 forma um clado distante de todas as estirpes de *C. striatum*, como um grupo de fora.

As diferenças entre as estirpes 2023 e 2308, do pulsotipo I, ficaram melhor evidenciadas quando se tem um grupo maior de genes constitutivos, como apresentadas nas análises filogenéticas baseadas no esquema de MLST de *C. diphtheriae* (**Figuras 5a, 5b e 5c**). Além disso, a região ITS, além de ser pequena, apresenta uma variabilidade muito grande e aliada ao número limitado de genes que compõem este esquema, pode justificar o fato deste não ter sido adotado pela comunidade científica.

4.5.3 Esquema de MLST de *C. macginleyi*

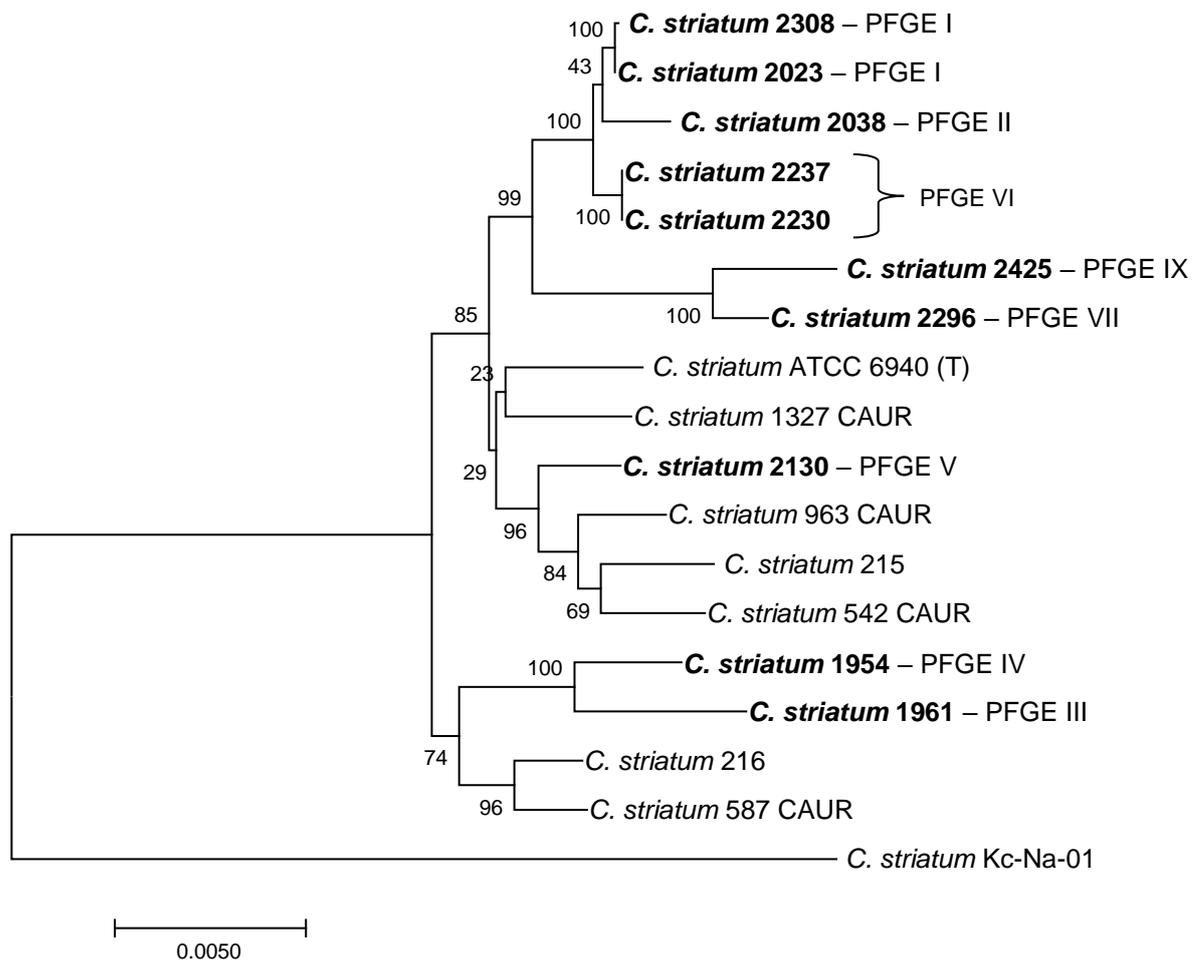
O esquema de MLST proposto por Eguchi et al (2008) foi o primeiro esquema de MLST desenhado para o gênero *Corynebacterium*, especificamente para *C. macginleyi*, para avaliar a relação epidemiológica entre as 16 estirpes de amostras oftalmológicas de 16 pacientes com infecções oculares. Utilizando este esquema, foram construídas as árvores filogenéticas representadas nas **Figuras 8a, 8b e 8c**, usando apenas as estirpes de *C. striatum* deste estudo; com estirpes de *C. striatum* de outros países e utilizando *C. simulans* como grupo de fora, respectivamente.

Figura 8a - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 7 genes constitutivos (10.140 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. macginleyi*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,001% de divergência. As sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *adk*, *gyrB*, *aspA*, *purA*, *dnaA*, *gltA* e *icd* das estirpes de *C. striatum* deste estudo foram utilizadas na construção desta árvore filogenética usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulstotipo designado pelas análises de PFGE.



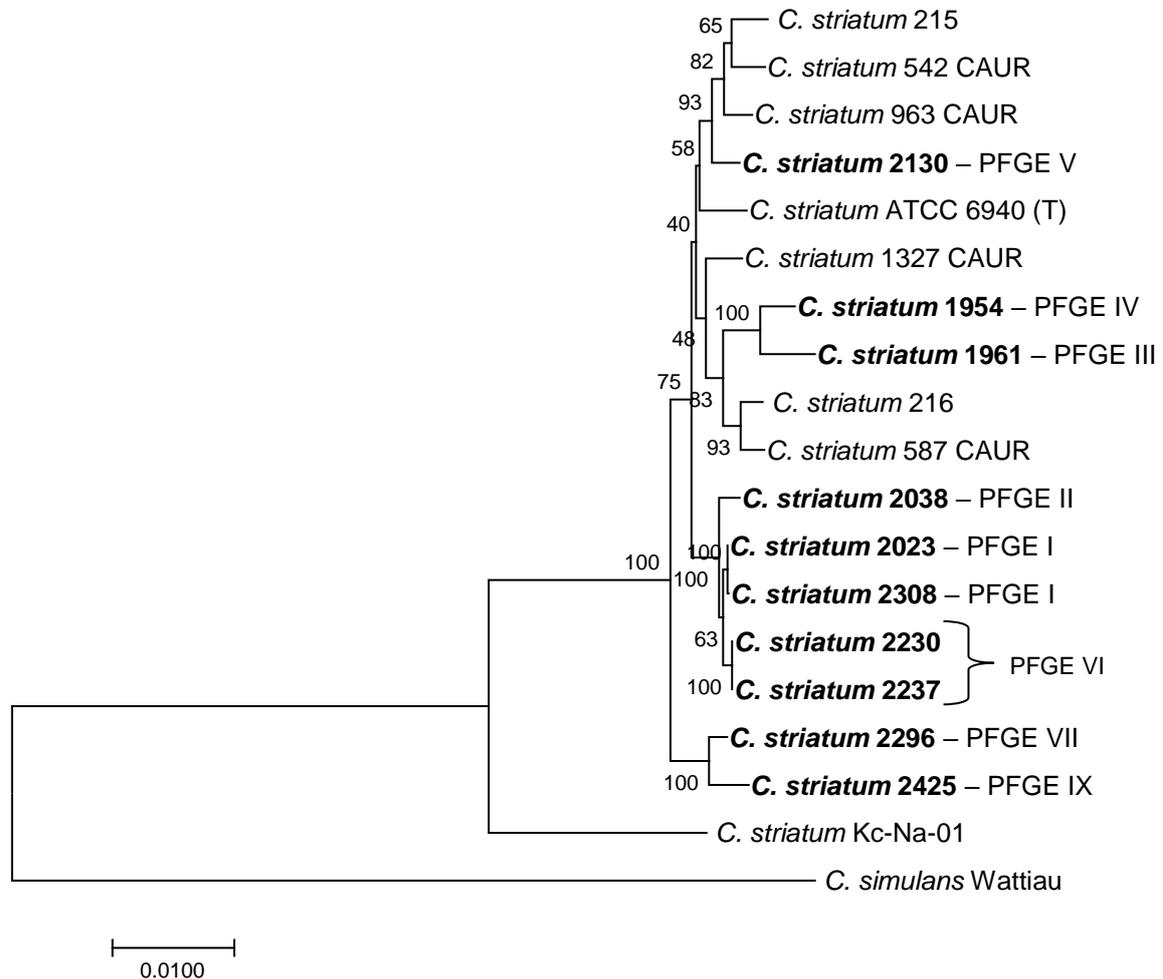
Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 8b - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 7 genes constitutivos (10.077 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. macginleyi*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,005% de divergência. (T) cepa tipo. Em destaque (negrito) as estirpes deste estudo. As sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *adh*, *gyrB*, *aspA*, *purA*, *dnaA*, *gltA* e *icd* das estirpes de *C. striatum* deste estudo e de outros países foram utilizadas na construção desta árvore filogenética usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulsotipo designado pelas análises de PFGE.



Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 8c - Árvore filogenética concatenada baseada nas sequências de 7 genes constitutivos (10.016 posições) utilizados no esquema de MLST de *C. macginleyi*. A distância foi inferida baseada no método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,01% de divergência. (T) cepa tipo. Em destaque (negrito) as estirpes deste estudo. Para a construção desta árvore filogenética foram utilizadas as sequências nucleotídicas dos genes constitutivos *adk*, *gyrB*, *aspA*, *purA*, *dnaA*, *gltA* e *icd* das estirpes de *C. striatum* deste estudo, de outros países e de *C. simulans* como grupo de fora usando o programa *MEGA*. Na frente de cada estirpe, o pulstotipo designado pelas análises de PFGE.



Fonte: (Da autora, 2018).

Na **Figura 8a**, em que foram utilizadas apenas as estirpes de *C. striatum* deste estudo, nota-se que as diferenças entre as estirpes 2023 e 2308, ambas do pulstotipo I, foram evidenciadas, semelhantes às encontradas nas análises filogenéticas baseadas no esquema de MLST de *C. striatum* (GOMILA et al, 2012). Essas estirpes seriam classificadas em ST diferentes. Já as estirpes do pulstotipo VI, 2230 e 2237, novamente foram agrupadas como pertencentes ao mesmo ST. As demais estirpes apresentaram variabilidade tanto pelo PFGE e pelo MLST, nas três análises filogenéticas acima (**Figura 8a, 8b e 8c**).

O MLST caracteriza os alelos presentes nos diferentes *loci* dos genes constitutivos. Avaliando os três esquemas de MLST aqui abordados, podemos concluir que o esquema baseado no MLST de *C. diphtheriae* apresentou maior poder discriminatório, especialmente entre as estirpes do pulsotipo I (2023 e 2308), sendo o esquema escolhido como o mais apropriado para discriminar as estirpes deste estudo. Estudos futuros para escolher o *loci* de cada gene constitutivo deste esquema para *C. striatum* e o desenho de oligonucleotídeos para amplificação e sequenciamento serão realizados.

Várias infecções nosocomiais e estudos de surtos têm empregado o PFGE para tipagem de estirpes de *C. striatum* (ALIBI et al, 2017, QIN et al, 2017, VERROKEN et al, 2014, WANG et al, 2016), mas este é um método de genotipagem demorado e padronizações para comparações inter-laboratoriais não existem para a genotipagem de estirpes de *C. striatum*. É uma ferramenta valiosa para investigar o parentesco clonal de estirpes microbianas durante surtos nosocomiais. Assim, o método só é aplicável para comparar estirpes para vigilância epidemiológica regional, já o MLST tem a vantagem de ser altamente reprodutível e seus resultados permitirem a comparação entre as estirpes do mundo todo (MAGALHÃES et al, 2005, KONIG et al, 2014).

Como foi possível observar anteriormente, em todas as árvores filogenéticas aqui apresentadas neste tópico de comparação entre MLST e PFGE, a estirpe Kc-Na-01, isolada na Coréia do Sul, agrupou-se distante das demais estirpes de *C. striatum*. Realizamos as abordagens taxonômicas descritas neste estudo para esta estirpe. Além disso, foi construída uma árvore-guia empregando-se o programa *Mauve*, utilizando-se outras seis espécies de corinebactérias filogeneticamente relacionados à espécie *C. striatum*. Os resultados podem ser visualizados no **ANEXO B**.

4.6 Análise fenotípica da resistência

Antes de realizar a caracterização genética da resistência, as dez estirpes que tiveram os genomas sequenciados foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em gradiente de concentração para determinação da CIM aos antimicrobianos descritos na **Tabela 4**.

A definição de resistência para a maioria das estirpes de *C. striatum* baseou-se nos pontos de corte para CIM definidos pelo documento CLSI M45-A2 (2010), por abranger um maior número de antimicrobianos em comparação com o documento do BrCAST (2017), conforme apresentado na **Tabela 1**. Todas as estirpes foram sensíveis aos antimicrobianos

tetraciclina, vancomicina, daptomicina e linezolida. As CIM encontradas para os demais antimicrobianos são discutidas de acordo com as classes dos antimicrobianos apresentadas no item a seguir.

4.7 Caracterização genética da resistência

Os dez genomas de *C. striatum* foram submetidos ao banco de dados *Resfinder*, *ARG-Annot* e *Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database* do NCBI para pesquisa de genes de resistência adquiridos e por mutações nos genes cromossomais associadas à resistência aos antimicrobianos, com o valor mínimo de 30% de similaridade e 40% de cobertura. Os genes de resistência adquiridos encontrados nos genomas são mostrados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Resultados encontrados nos bancos de dados de genes de resistência

Estirpes	<i>ermX</i>	<i>cmx</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA-tetB</i>	<i>tetW</i>
1954	-	-	-	-	-	-	+	-
1961	-	-	-	-	-	-	+	-
2023	+	+	+	+	+	-	+	-
2038	+	+	+	+	+	-	+	-
2130	+	+	+	+	+	+	+	-
2230	+	+	+	+	+	-	+	-
2237	+	+(2)	+	+	+	-	+	-
2296	+	+	+	+	+	+	+	+
2308	+	+(2)	+	+	+	-	+	-
2425	+	+	+(2)	+(2)	+	+(2)	+	+

ermX: resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B; *cmx*: resistência ao cloranfenicol; *aph(3'')-Ib-aph(6)-Id*: resistência à estreptomicina, *aph(3')-Ia*: resistência aos aminoglicosídeos; *sul1*: resistência às sulfonamidas; *tetA-tetB* e *tetW*: resistência às tetraciclinas; (+) presente; (-) ausente; números entre parênteses indicam a quantidade de cópias encontradas nos genomas.

Fonte: (Da autora, 2018).

Os genes *ermX*, *cmx*, *aph(3'')-Ib-aph(6)-Id* e *aph(3')-Ia* foram encontrados nas estirpes deste estudo, exceto nas estirpes multissensíveis 1954 e 1961. O gene *sul1*, que confere resistência às sulfonamidas e geralmente está associado aos integrons, foi encontrado apenas em três estirpes (2130, 2296 e duas cópias na estirpe 2425), as mesmas em que o gene da integrase I foi amplificado por PCR, como descrito anteriormente. Os pares de genes *tetA-tetB* que não foram amplificados por PCR foram encontrados em todas as estirpes. Cada gene encontrado nos bancos de dados é discutido nos próximos tópicos, de acordo com a classe dos antimicrobianos, relacionando-os aos respectivos perfis de susceptibilidade encontrados.

A pesquisa por mutações em genes constitutivos realizada no banco de dados *ARG-Annot* não resultou em nenhum achado nos 10 genomas analisados, porém, mutações em

genes constitutivos, como *gyrA* e *rpoB*, por exemplo, foram encontradas usando o banco de dados *Resfinder*, tendo *M. tuberculosis* a espécie mais próxima para comparação.

A relação entre os genes de resistência encontrados nos genomas e a CIM das estirpes determinada por difusão em gradiente de concentração aos diversos antimicrobianos será discutida nos tópicos seguintes.

4.7.1 Resistência aos macrolídeos e lincosamidas (MLSB)

O gene *ermX* (cópia única, tamanho de 763 pb) foi o único gene relacionado à resistência aos macrolídeos e lincosamidas encontrado em 8 genomas de *C. striatum*, usando os bancos de dados de genes de resistência. Este gene não foi localizado nos genomas das estirpes sensíveis 1954 e 1961 e da cepa tipo ATCC 6940 (Genbank nº ACGE01000000). Todas as estirpes *ermX*-positivas foram resistentes à clindamicina e à eritromicina e a CIM para ambos os antimicrobianos são mostrados na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Correlação entre a presença do gene *ermX* e a CIM dos antimicrobianos clindamicina e eritromicina nas diferentes estirpes deste estudo e na cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940.

Presença ou ausência do gene <i>ermX</i>	Estirpes	Agentes Antimicrobianos (CIM mg/L)					
		Clindamicina			Eritromicina		
		S	I	R	S	I	R
		0.5	1-2	4	0.5	1	2
<i>ermX</i> -positivas	2023, 2038, 2130, 2230, 2237, 2296, 2308	>256			>256		
	2425	>256			4		
<i>ermX</i> -negativas	1954	0.12			0.03		
	1961	0.12			<0.015		
	ATCC 6940	0.5			<0.015		

CIM, concentração inibitória mínima; S, sensível; I, intermediário; R, resistente. Pontos de corte obtidos no documento do CLSI M45-A (2010). O documento do BrCAST (2017) traz pontos de corte apenas para clindamicina (S ≤0.5 e R >0.5) para *Corynebacterium* spp.

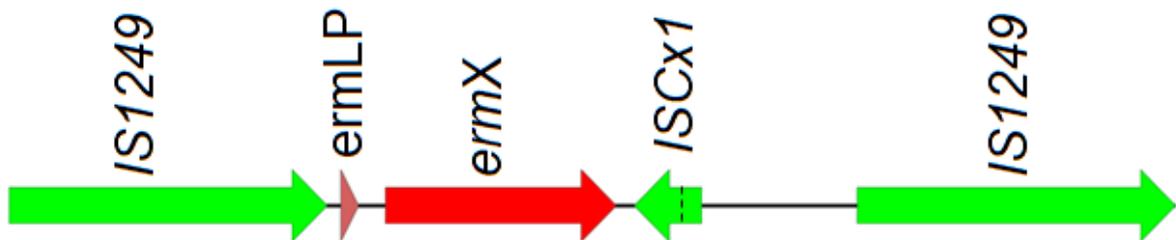
Fonte: (Da autora, 2018).

Em estudos realizados por Ortiz-Pérez et al (2010) com 256 estirpes clínicas de *Corynebacterium* spp., foi encontrado o fenótipo de resistência aos antimicrobianos MLSB em 186 estirpes. Este fenótipo foi associado com a presença das enzimas metilases codificadas pelo gene *ermX* em 171 estirpes. Em nossos estudos, o gene *ermX* foi encontrado em 20 de 21 estirpes (**Tabela 5**). Todas as estirpes *ermX*-positivas foram resistentes aos antimicrobianos clindamicina e eritromicina. A resistência aos macrolídeos é principalmente devido às enzimas metilases, que são codificadas pelos genes *erm*. Outros mecanismos de

resistência, tais como, mutações no domínio V do gene 23S rRNA, modificações de proteínas L4 e L22, sistemas de bombas de efluxo e enzimas hidrolíticas têm sido reportados em diferentes gêneros bacterianos (ORTIZ-PÉREZ et al, 2010).

Em corinebactérias, o gene *ermX* já foi detectado em diferentes espécies, como *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. xerosis*, *C. striatum* e *C. pseudodiphtheriticum*, em plasmídeos, transposons e cromossomo (OLENDER, 2013). Em nossas estirpes, o gene *ermX* foi encontrado nos cromossomos. Na estirpe 2130, o gene *ermX* foi detectado no transposon *Tn5432*, integrado no cromossomo, flanqueado pela *IS1249* (**Figura 9**), com a mesma organização descrita nos plasmídeos pTP10 de *C. striatum* M82B (Genbank nº U21300) e pNG2 de *C. diphtheriae* S601 (Genbank nº AF492560), porém, a transposase *ISCx1* encontra-se incompleta, assim como em vários outros genomas deste estudo.

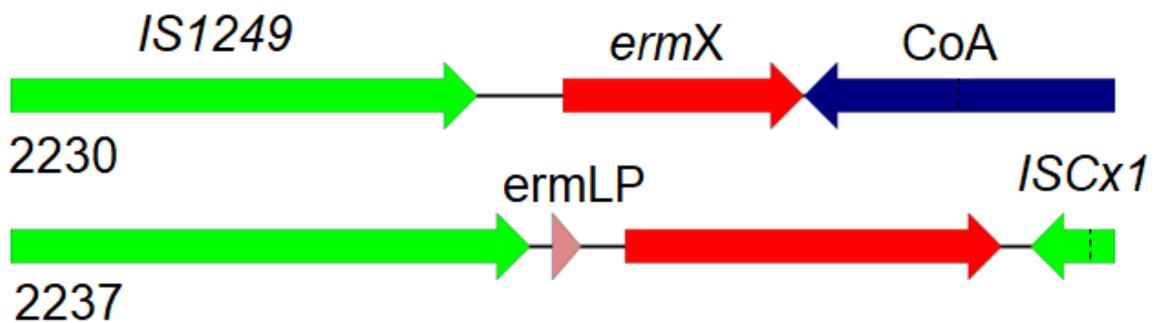
Figura 9 - Organização genética do transposon *Tn5432* encontrado na estirpe 2130, mostrando o gene *ermX* flanqueado pelas *IS1249* e adjacente ao gene *ermX*, a sequência de inserção *ISCx1* incompleta. Os traços dentro da *ISCx1* indicam que está incompleta. *ErmLP*, também denominada “leader peptide”, é uma sequência curta de peptídeos que modula a transcrição ou tradução do RNA mensageiro (TAUCH et al, 2000, TRENT; van der DONK, 2010).



Fonte: (Da autora, 2018).

As estirpes 2230 e 2237, do mesmo paciente e pulsotipo VI, apresentam organizações genéticas do gene *ermX* diferentes. A estirpe 2237 tem quase a estrutura completa do transposon *Tn5432*, carecendo da *IS1249* subjacente a *ISCx1*, conforme representado na **Figura 10**. Já a estirpe 2230, apresenta uma CDS incompleta da proteína de ligação à coenzima A (coA), pertencente à superfamília NAT (N-acetiltransferase) de enzimas que catalisam principalmente a transferência de um grupo acyl para o substrato e estão implicadas em uma variedade de funções, variando de resistência bacteriana aos antimicrobianos ao ritmo circadiano em mamíferos (VETTING et al, 2005).

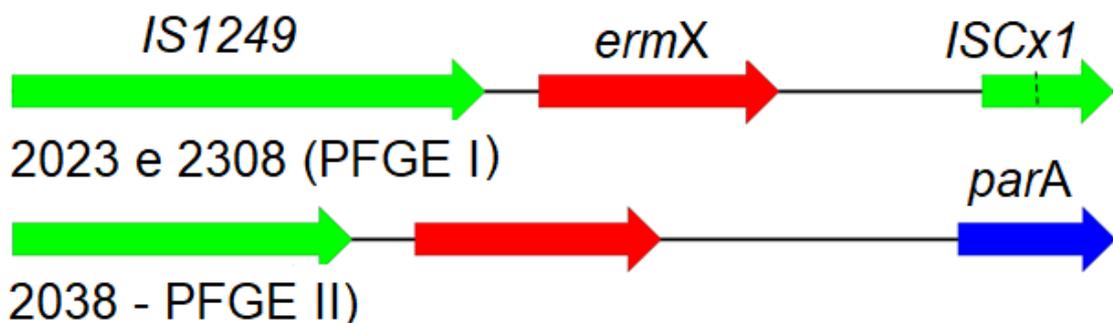
Figura 10 - Contexto genômico do gene *ermX* encontrado nos cromossomos das estirpes 2230 e 2237, do mesmo paciente e pertencentes ao pulsotipo VI. Na estirpe 2230, subjacente ao gene *ermX*, há uma CDS incompleta, que codifica a proteína de ligação à coenzima A (coA). Os traços dentro dos genes codificantes de coA (estirpe 2230) e *ISCx1* (estirpe 2237) indicam que são incompletas.



Fonte: (Da autora, 2018).

Nas estirpes 2023, 2028 e 2308, a *IS1249* encontra-se adjacente ao gene *ermX* e subjacente a este, composições genéticas diferentes podem ser observadas, conforme demonstrado na **Figura 11**. A *IS1249* não foi encontrada nas estirpes 2296 e 2425.

Figura 11 - Contexto genômico do gene *ermX* encontrado nos cromossomos das estirpes 2023 e 2308 (pulsotipo I) e 2038 (pulsotipo II), com o gene *parA* subjacente ao gene *ermX*. Nas estirpes 2023 e 2308 encontra-se a *ISCx1* incompleta subjacente ao gene *ermX*.



Fonte: (Da autora, 2018).

Subjacente ao gene *ermX* na estirpe 2038 (**Figura 11**), encontra-se o gene codificante da proteína da família ParA, implicada na segregação de cromossomos, que assegura a herança estável do material genético antes da divisão celular. Muitos cromossomos bacterianos e plasmídeos de baixa cópia, como os plasmídeos P1 e F, possuem os genes *parA*

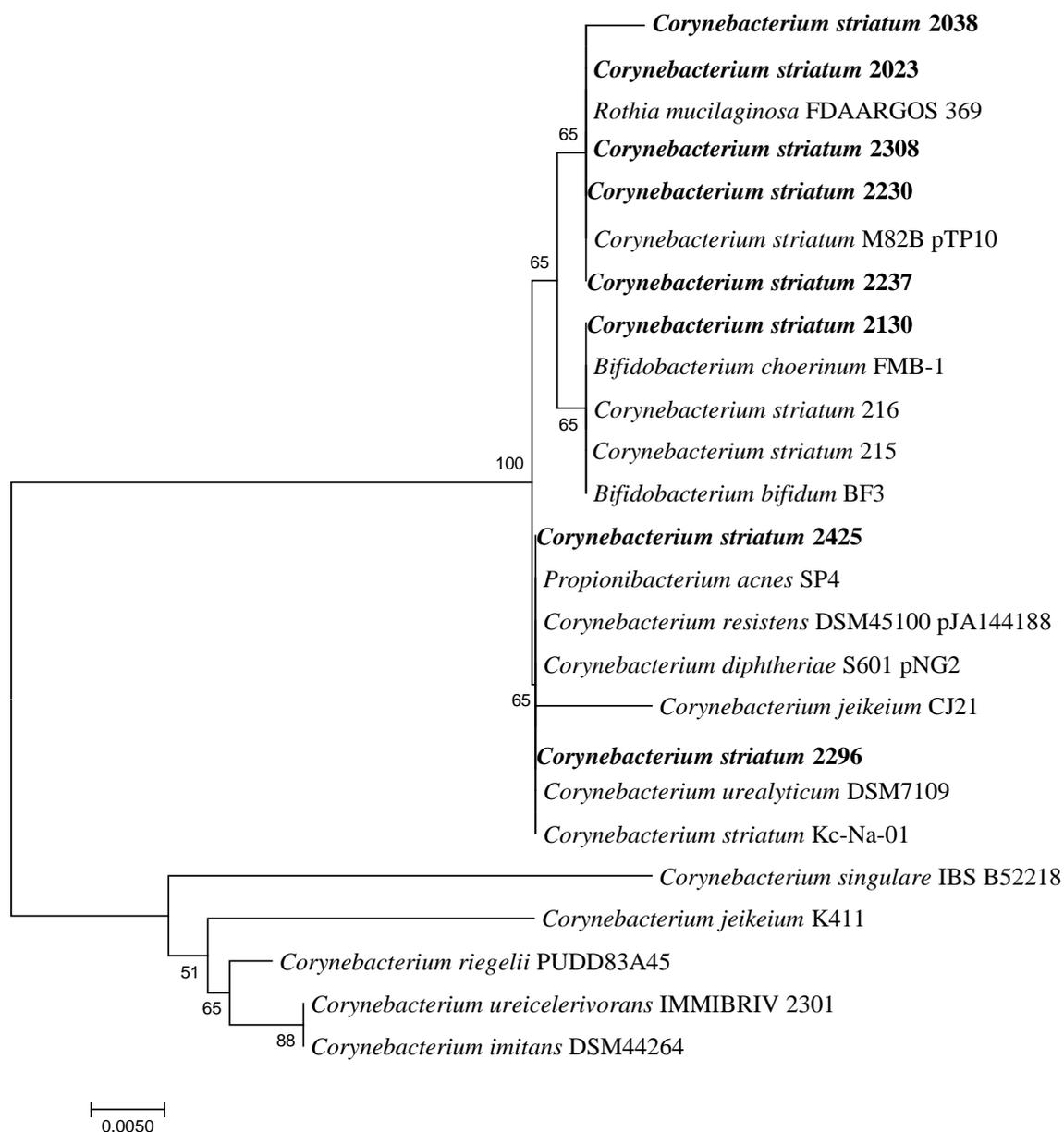
e *parB*, que codificam proteínas que atuam para garantir melhor particionamento do cromossomo e assim uma fiel transmissão da informação genética para as células filhas (BIGNELL; THOMAS, 2001, HWANG et al, 2013). Após a CDS da proteína da família ParA, encontra-se uma CDS incompleta de uma transposase da família IS3 (não mostrada na figura).

A análise filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene *ermX* mostrou o agrupamento das proteínas em três clados distintos (**Figura 12**). A sequência de aminoácidos do gene *ermX* da estirpe 2130 integrada no *Tn5432*, apresenta 100% de similaridade com o gene *ermX* localizado nos genomas das espécies *Bifidobacterium bifidum* BF3 e *Bifidobacterium choerinum* FMB-1. Estas espécies de *Bifidobacterium* fazem parte da microbiota comensal de intestinos de mamíferos, aves e insetos sociais, que influenciam o metabolismo/fisiologia do hospedeiro (DURANTI et al, 2015). A sequência de aminoácidos do gene *ermX* da estirpe 2130 também apresenta 100% de similaridade com as sequências encontradas nos genomas das estirpes multirresistentes de *C. striatum* 215 e 216 isoladas nos Estados Unidos. Guirao et al (2005) detectaram o gene *ermX* em todas as estirpes resistentes à eritromicina de *C. jeikeium* e *C. amycolatum* com 100% de homologia com o gene *ermX* de *C. striatum* e *C. diphtheriae*.

As sequências de aminoácidos do gene *ermX* de 2023, 2230, 2237 e 2308 apresentam 100% de similaridade com as sequências do gene *ermX* encontrado no plasmídeo pTP10 da estirpe M82B de *C. striatum*, isolado na Itália, resistente à eritromicina e à clindamicina (TAUCH et al, 2000).

As sequências do gene *ermX* das estirpes 2296 e 2425 são 100% idênticas às sequências dos genes encontrados em outras espécies de *Corynebacterium*, como nos plasmídeos de *C. resistens* e *C. diphtheriae* e também em *Propionibacterium acnes*, comensal da microbiota de pele, que tem um importante papel na patogênese da acne e em doenças inflamatórias crônicas de pele (NGUYEN; SAH; KIM, 2018). A estirpe de *C. jeikeium* CJ21 e as cepas tipo de *C. urealyticum* DSM 7109, *C. imitans* DSM 44264 e *Corynebacterium ureicelerivorans* IMMIB RIV-2301 são resistentes à clindamicina e à eritromicina. As demais estirpes de corinebactérias tem fenótipos desconhecidos (MOLLMANN et al, 2014, TAUCH et al, 2008, TIPPELT et al, 2014).

Figura 12 - Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene *ermX* (253 posições), utilizando o método de *Neighbor-Joining* (p-distance). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,005% de divergência. As análises filogenéticas das sequências de aminoácidos do gene *ermX* indicam uma alta similaridade nas sequências entre as nossas estirpes (destacadas em negrito) e com outras espécies de corinebactérias e outros gêneros, tais como *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium acnes* e *Rothia mucilaginosa*.



Fonte: (Da autora, 2018).

Outros genes relacionados à resistência ao MLSB, como genes codificantes de enzimas inativantes e bombas de efluxo foram pesquisados. As sequências de proteínas relacionadas à resistência aos antimicrobianos MLSB, depositadas nos bancos de dados de genes de resistência utilizados neste estudo foram submetidas ao alinhamento local pelo *Blastx* no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v. 7.2.5 (HALL, 1999), com limite mínimo de busca (30%). Apenas o gene *ermX* foi encontrado nos genomas, exceto nas estirpes 1954, 1961 e na cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940. Como nenhum outro gene relacionado à resistência aos antimicrobianos MLSB foi localizado, o gene *ermX* provavelmente é o responsável pela resistência à eritromicina (macrolídeo) e à clindamicina (lincosamida) em nossas estirpes.

4.7.2 Resistência às quinolonas

4.7.2.1 Gene *gyrA*

Estudos das sequências da região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) do gene *gyrA*, codificante da subunidade A da enzima girase, em estirpes de *C. striatum*, *C. amycolatum* e *C. macginleyi* mostraram que a resistência às quinolonas está associada com mutações de natureza espontânea, dependendo do número de mutações e do tipo de aminoácido que foi substituído (SIERRA et al, 2005, EGUCHI et al, 2008, ALIBI et al, 2017).

Neste estudo, analisamos as sequências da região QRDR das 21 estirpes inicialmente investigadas, descritas na **Tabela 2**. Deste total, 20 estirpes foram resistentes aos antimicrobianos ciprofloxacino e moxifloxacino, pelo método de disco-difusão (**ANEXO A**), exceto a estirpe multissensível 2376, isolada de neonato. Todas as estirpes e a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 foram então submetidas ao teste de suscetibilidade ao ciprofloxacino para determinação da CIM por difusão em gradiente de concentração e posterior comparação com as posições 87 e 91 da região QRDR. Assim, as sequências de aminoácidos da região QRDR foram alinhadas e relacionadas à CIM de ciprofloxacino e são mostradas na **Tabela 14**. A sequência de aminoácidos do gene *gyrA* da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 (Genbank nº AY559038) susceptível ao ciprofloxacino foi utilizada como controle.

Tabela 14 - Relação entre as mutações na região QRDR do gene *gyrA* e as CIMs para as 21 estirpes de *C. striatum*.

Nº de estirpes	GyrA (aminoácido)		Ciprofloxacino	
	Ser-87	Asp-91	CIM (mg/L)	Fenótipo
13	Val	Asp	>32	R
1	Phe	Asp	>32	R
2	Val	Asn	>32	R
3	Phe	Ala	>32	R
1	Tyr	Asp	2	R ou I
1	Ser	Asp	0,125	S
ATCC 6940	Ser	Asp	0,094	S

QRDR, região determinante de resistência à quinolona; CIM, concentração inibitória mínima; R, resistente; S, sensível; I, intermediário; Ser, serina; Asp, ácido aspártico; Val, valina; Asn, asparagina; Phe, fenilalanina; Ala, alanina; Tyr, tirosina.

Fonte: (Da autora, 2018).

Vinte estirpes apresentaram mutações nas posições 87 e/ou 91 da região QRDR. Destas, apenas cinco apresentaram dupla mutação nas posições 87 e 91 simultaneamente. Dezenove estirpes apresentaram CIM para ciprofloxacino superiores a 32 mg/L e uma estirpe apresentou CIM = 2 mg/L. A estirpe 2376, isolada de neonato, foi a única sensível ao ciprofloxacino (CIM 0,125 mg/L) e pelo método de disco-difusão, sendo também sensível ao antimicrobiano moxifloxacino pelo método de disco-difusão (**ANEXO A**).

A maioria das estirpes (N=15) apresentou mutação apenas na posição 87 da região QRDR. Destas, em treze estirpes o aminoácido trocado foi de serina (Ser) para valina (Val); em uma estirpe, de serina (Ser) para fenilalanina (Phe) e em uma estirpe, de serina (Ser) para tirosina (Tyr). Quando a serina (Ser) foi substituída para valina (Val) ou fenilalanina (Phe), as CIM nestas 14 estirpes foram superiores a 32 mg/L. A estirpe 2130, que teve o aminoácido serina (Ser) substituído para tirosina (Tyr), apresentou CIM = 2 mg/L. Estes achados corroboram com estudos anteriormente publicados, em que o nível de resistência às quinolonas depende do tipo de aminoácido que foi substituído (SIERRA et al, 2005, EGUCHI et al, 2008, ALIBI et al, 2017).

Até o presente momento, as combinações dos aminoácidos Val/Asn (valina/asparagina) nas posições 87 e 91 da região QRDR do gene *gyrA*, respectivamente, encontrada em duas das estirpes aqui estudadas, não foram descritas na literatura para as

espécies de *Corynebacterium*, conferindo resistência aos antimicrobianos ciprofloxacino e moxifloxacino.

Como demonstrado na **Tabela 1**, o documento M45-A2 (2010) do CLSI traz pontos de corte apenas para o antimicrobiano ciprofloxacino. Já o documento do BrCAST (2017), baseado no documento do EUCAST, não traz pontos de corte para o antimicrobiano levofloxacino. Devido à carência de pontos de corte de alguns antimicrobianos para as corinebactérias, muitos pesquisadores utilizam os pontos de corte para *Staphylococcus* spp. (ALIBI et al, 2017, BAIIO et al, 2013, OLENDER, 2013). Além disso, para alguns antimicrobianos, como ciprofloxacino, os valores de pontos de corte para definição de resistência são discrepantes. Assim, a estirpe 2130 que apresentou CIM = 2 mg/L para o antimicrobiano ciprofloxacino, pode ser interpretada como fenótipo intermediário, quando se utiliza o documento M45-A2 do CLSI (2010) ou como fenótipo resistente, quando se utiliza o documento do BrCAST (2017), cujos pontos de corte são listados na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Pontos de corte para quinolonas descritos nos documentos CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017)

Agentes antimicrobianos	CLSI M45-A2			BrCAST		
	S ≤	I	R ≥	S ≤	I	R >
Ciprofloxacino	1	2	4	1	-	1
Levofloxacino	1	2	4	1	-	1
Moxifloxacino	1	2	4	0,5	-	0,5

S, sensível; I, intermediário; R, resistente. Devido à ausência de pontos de corte para corinebactérias para os antimicrobianos levofloxacino e moxifloxacino no documento do CLSI M45-A2, utilizamos os pontos de corte para *Staphylococcus* spp., obtidos nos documentos do CLSI M100S (2016). O BrCAST não traz pontos de corte para o antimicrobiano levofloxacino, então os pontos de corte para *Staphylococcus* spp. foram utilizados.

Fonte: (Da autora, 2018).

Para as dez estirpes com os genomas sequenciados, a CIM para levofloxacino e moxifloxacino foi realizada. A relação entre as mutações nas posições 87 e 91 da região QRDR do gene *gyrA* com as CIM encontradas está mostrada na **Tabela 16**, comparando com a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 susceptível às quinolonas. Apenas duas estirpes (2296 e 2425) carregam mutações nas posições 87 (Ser-serina para Phe-fenilalanina) e 91 (Asp-ácido aspártico para Ala-alanina) simultaneamente, resultando na maior CIM encontrada para o antimicrobiano moxifloxacino (>32 mg/L). As estirpes 2023, 2038, 2230, 2237 e 2308 apresentaram mutações apenas na posição 87 (Ser-serina para Val-valina) e os valores da CIM

para os antimicrobianos ciprofloxacino e levofloxacino foram idênticos (>32 mg/L) e os valores da CIM para moxifloxacino, variaram entre 4-8 mg/L.

Tabela 16 - Relação entre as mutações na região QRDR do gene *gyrA* e as CIM para as estirpes de *C. striatum* com genoma sequenciado.

Estirpes	GyrA (aminoácidos)		CIM (mg/L)		
	Ser-87	Asp-91	CIP	LEV	MOX
2130	Tyr	Asp	2	1.5	0,75
2296, 2425	Phe	Ala	>32	>32	>32
2023	Val	Asp	> 32	>32	8
2038			> 32	>32	6
2230			> 32	>32	8
2237			> 32	>32	4-6
2308			> 32	>32	6
1954	Ser	Asp	0,094	0,025	0,125
1961			0,125	0,094	0,125
ATCC 6940			0,094	0,19	0,125

CIM, concentração inibitória mínima; CIP, ciprofloxacino; LEV, levofloxacino; MOX, moxifloxacino; Tyr, tirosina; Asp, ácido aspártico; Phe, fenilalanina; Ala, alanina; Val, valina. Em negrito estão destacadas as estirpes sensíveis às quinolonas (1954 e 1961), bem como a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940.

Fonte: (Da autora, 2018).

A estirpe 2130 anteriormente discutida, carrega mutação apenas na posição 87, ocasionando na mudança do aminoácido serina (Ser) para tirosina (Tyr) e na menor CIM encontrada para o fenótipo de resistência ao antimicrobiano moxifloxacino (0,75 mg/L).

As estirpes 1954, 1961 e a cepa de *C. striatum* ATCC 6940, sensíveis às quinolonas, não apresentaram mutações nessas posições. Como descrito na literatura, estas estirpes possuem na posição 87 o aminoácido serina (Ser) e na posição 91, o aminoácido ácido aspártico (Asp). Uma única mutação na posição 87 foi encontrada em seis estirpes, mas apenas naquelas (N=5) em que houve substituição do aminoácido serina (Ser) para o aminoácido valina (Val), encontramos a CIM para ciprofloxacino e levofloxacino superiores a 32 mg/L. Quando o aminoácido serina (Ser) foi substituído para o aminoácido tirosina (Tyr) na posição 87 (estirpe 2130), as CIM para ciprofloxacino e levofloxacino foram iguais e inferiores a 2, respectivamente. Novamente, corroborando com estudos anteriormente publicados, em que o nível de resistência às quinolonas depende do tipo de aminoácido que foi substituído (SIERRA et al, 2005, EGUCHI et al, 2008, ALIBI et al, 2017). Apenas as

estirpes que apresentaram dupla mutação (posições 87 e 91) na região QRDR do gene *gyrA* apresentaram CIM para moxifloxacino superiores a 32 mg/L (**Tabela 16**).

4.7.2.2 Genes *gyrB* e *parC* e *parE*

As sequências do gene *gyrB* (topoisomerase II), incluindo a sequência da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 não apresentaram nenhuma mudança associada à resistência às quinolonas.

Buscamos as sequências nucleotídicas e de aminoácidos dos genes *parC* e *parE* de várias espécies, como *Bacillus* spp., *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Shigella flexneri* e diversos outros gêneros bacterianos, disponíveis no Genbank. Utilizamos os algoritmos *Blastn* e *Blastx*, no programa *Bioedit* (limite de 30% para busca) para a pesquisa dos genes *parC* e *parE* em nossos genomas e também nos genomas da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940, *C. diphtheriae* NCTC 13129 (Genbank nº NC002935) e na estirpe brasileira de *C. diphtheriae* BH8 (Genbank nº CP003209). Assim como nos genomas de *M. tuberculosis*, *H. pylori* e *T. pallidum* (HOOPER; JACOBY, 2015), os genes *parC* e *parE* (subunidades da topoisomerase IV) não foram localizados nos genomas de *C. striatum*, incluindo a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 e também nos dois genomas completos de *C. diphtheriae* acima mencionados.

4.7.2.3 Genes de resistência mediados por plasmídeos e bombas de efluxo

A busca por genes mediados por plasmídeos, como os genes codificantes de proteínas de proteção ao sítio alvo (Qnr), alteração do antimicrobiano e por genes codificantes de bombas de efluxo (OqxAB-QepA) não resultou em nenhum achado.

4.7.3 Resistência às tetraciclina

A expressão dos pares de genes *tetA-tetB* é um dos principais mecanismos de resistência às tetraciclina em corinebactérias. Os genes *tetAB*, que atuam como bomba de efluxo da tetraciclina, conferem resistência à tetraciclina, à oxitetraciclina e em menor nível, seus outros derivados, como clortetraciclina, minociclina e doxiciclina. A bomba de efluxo resultante da expressão desses genes levou a resistência ao β -lactâmico oxacilina em algumas corinebactérias (OLENDER, 2012, SALEM et al, 2015, TAUCH et al, 1999).

Neste estudo, investigamos a presença dos genes *tetAB* por PCR nas 21 estirpes inicialmente trabalhadas antes do sequenciamento dos genomas. Os genes *tetAB* não foram amplificados em nenhuma das estirpes. Após o sequenciamento dos genomas, usamos a ferramenta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e verificamos que o *primer* da fita reversa não anelou em nenhuma estirpe, por isso que não foi possível amplificar estes genes por PCR.

Todas as estirpes foram submetidas ao teste de suscetibilidade à tetraciclina pelo método de difusão em gradiente de concentração (**ANEXO A**) e apresentaram CIM menores ou igual a 2 mg/L. As 21 estirpes foram consideradas susceptíveis à tetraciclina, mesmo considerando a discrepância nos pontos de corte descritos nos documentos do CLSI e BrCAST, como demonstrado na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Pontos de corte para tetraciclina descritos nos documentos CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017)

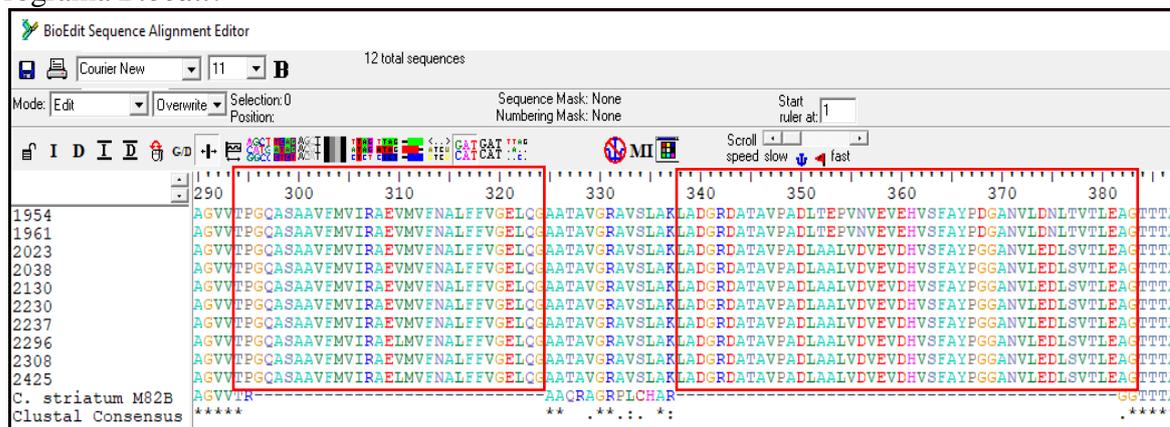
Agente antimicrobiano	CLSI M45-A2			BrCAST		
	S ≤	I	R ≥	S ≤	I	R >
Tetraciclina	4	8	16	2	-	2

O ponto de corte para definição de fenótipo resistente à tetraciclina descrito no documento do CLSI é oito vezes maior que o valor descrito no documento do BrCAST, baseado no documento do EUCAST.

Fonte: (Da autora, 2018).

Os genomas de *C. striatum* e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 foram submetidos aos bancos de dados para pesquisa de genes relacionados à resistência às tetraciclinas. Localizamos os genes *tetAB* apenas pelo banco de dados do NCBI nos dez genomas deste estudo. Estes pares de genes foram primeiramente descritos no plasmídeo pTP10 de *C. striatum* M82B (Genbank nº AF024666). Não localizamos estes genes na cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940, que apresenta o fenótipo sensível à tetraciclina (CIM = 0,25 mg/L). Quando a comparação desta região da tetraciclina foi analisada, observamos uma possível inserção de 217 pb na sequência do gene *tetB* das estirpes utilizadas neste estudo em relação ao gene *tetB* de *C. striatum* M82B (**Figura 13**).

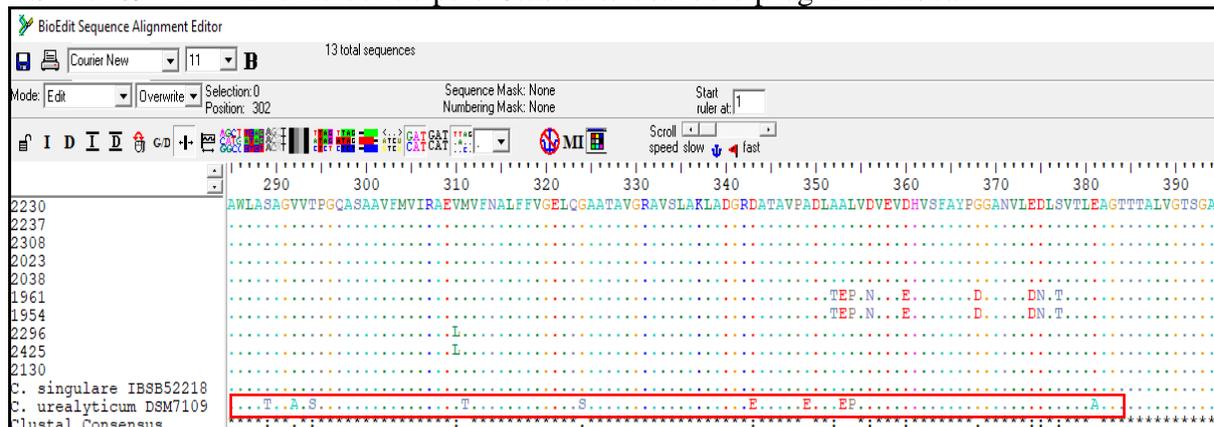
Figura 13 - Alinhamento da sequência de aminoácidos do gene *tetB* das estirpes de *C. striatum* deste estudo e da estirpe *C. striatum* M82B. Em destaque a possível inserção no gene *tetB* das estirpes de *C. striatum* deste estudo. Alinhamento obtido pelo *Clustal W* usando o programa *Bioedit*.



Fonte: (Da autora, 2018).

De acordo com a análise da sequência de 217 pb (*Blastn* – NCBI), este segmento apresentou 99,54% de similaridade com o gene *tetB* da cepa tipo de *Corynebacterium singulare* IBS B52218 (Genbank nº CP010827), cujo fenótipo de suscetibilidade à tetraciclina é desconhecido (não informado) e 86,17% de similaridade com o gene *tetB* da cepa tipo de *C. urealyticum* DSM 7109, fenótipo resistente à tetraciclina. Observamos oito aminoácidos diferentes nessa região do gene *tetB* da cepa tipo *C. urealyticum* DSM 7109 quando comparada com as sequências de aminoácidos do gene *tetB* de nossas estirpes e da cepa tipo de *C. singulare* IBS B52218 (Figura 14). Entretanto, todas as nossas estirpes foram sensíveis à tetraciclina.

Figura 14 - Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *tetB* das nossas estirpes de *C. striatum* com as cepas tipo de *C. urealyticum* DSM 7109 e *C. singulare* IBS B52218. Em destaque as diferenças de aminoácidos encontradas na região de 217 pb de *C. urealyticum* DSM 7109. Alinhamento obtido pelo *Clustal W* usando o programa *Bioedit*.

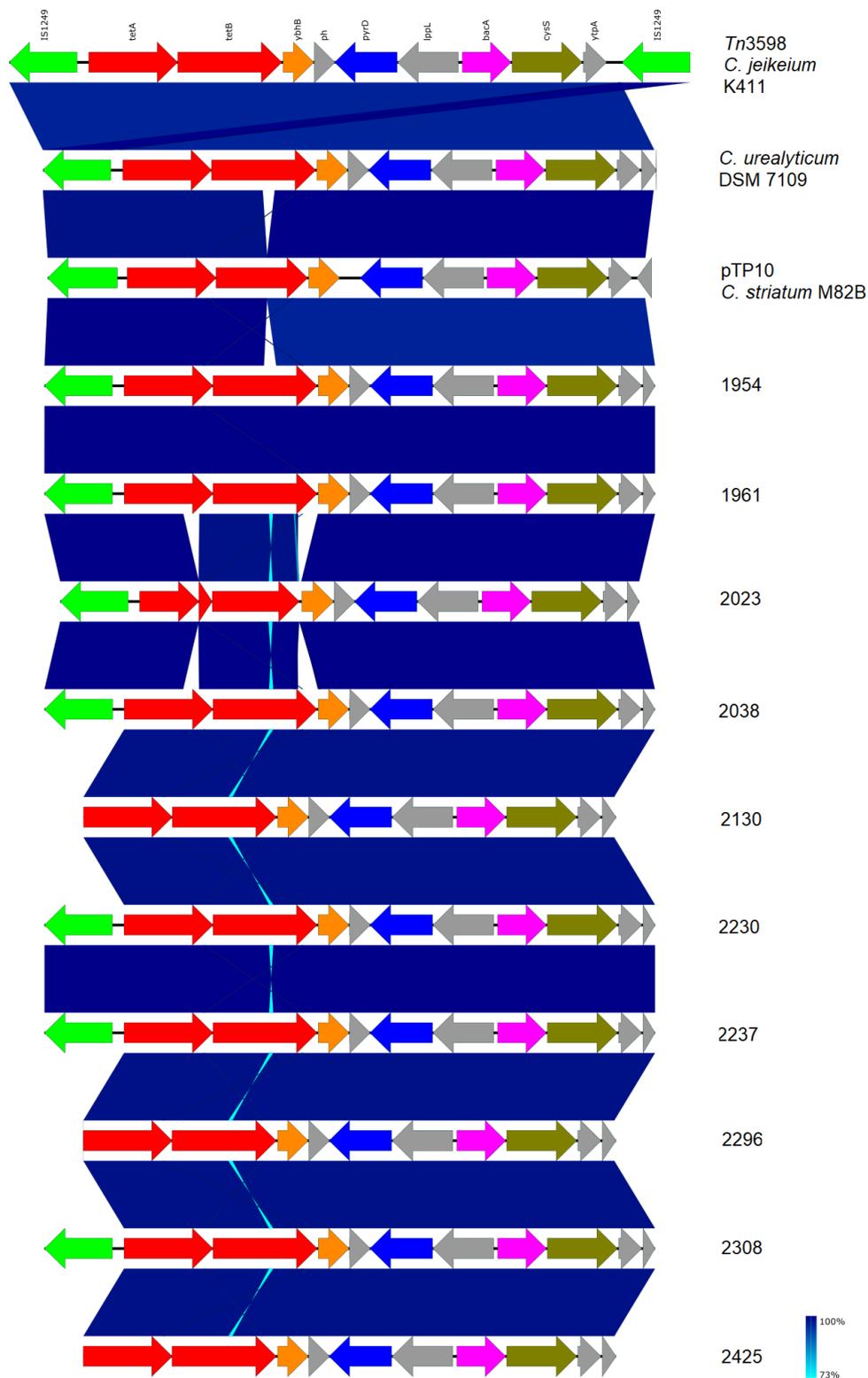


Fonte: (Da autora, 2018).

Os genes *tetAB* fazem parte do segmento II do plasmídeo pTP10 de *C. striatum* M82B. Adjacente ao *tetA* encontra-se o transposon Tn5432, que flanqueia o gene *ermX*, relacionado à resistência aos macrolídeos e lincosamidas em corinebactérias (TAUCH et al, 2000). Na **Figura 15** encontramos a IS1249 (que é parte do Tn5432) adjacente ao gene *tetA*, exceto nas estirpes 2130, 2296 e 2425. Em estudos experimentais feitos por Tauch et al (1999), a IS1249 (adjacente ao gene *tetA*) e o gene *ybhB* (adjacente ao gene *tetB*) fazem parte da região de resistência dos genes *tetAB* de *C. striatum* M82B e são importantes, uma vez que a ausência dos fragmentos destes genes tornaram a linhagem sensível. As sequências de aminoácidos e nucleotídeos da IS1249 das estirpes deste estudo apresentaram 100% de identidade com as sequências das IS1249 das estirpes *C. striatum* M82B, *C. jeikeium* K411 e da cepa tipo de *C. urealyticum* DSM 7109, apresentadas na **Figura 15**. As sequências de aminoácidos do gene *ybhB* da estirpe *C. striatum* M82B e da cepa tipo de *C. urealyticum* DSM 7109, com fenótipos de resistência à tetraciclina, apresentaram mutações que não foram encontradas nas sequências de aminoácidos do gene *ybhB* das estirpes de *C. striatum* deste estudo, bem como na estirpe *C. jeikeium* K411, cujo fenótipo de resistência às tetraciclinas é desconhecido. Estas mutações encontradas no gene *ybhB* podem estar relacionadas ao fenótipo de resistência às tetraciclinas na estirpe de *C. striatum* M82B e na cepa tipo de *C. urealyticum* DSM 7109, uma vez que este gene e a IS1249 são importantes para a expressão dos pares de genes *tetA-tetB*, como descrito por Tauch et al (1999).

Na região dos genes *tetAB* encontram-se alguns genes com elevada similaridade com proteínas codificadas no cromossomo de *M. tuberculosis*, como por exemplo, a proteína de regulação da fosforilação das quinases (codificada pelo gene *ybhB*); a enzima didydroorotate dehydrogenase, envolvida no transporte de nucleotídeos e metabolismo, codificada pelo gene *pyrD*; uma prolipoproteína hipotética (gene *lppL*); a enzima undecaprenil-difosfatase, envolvida na resistência à bacitracina, codificada pelo gene *bacA* e finalmente, a proteína análoga à glutationa, envolvida na biossíntese do micotiol (codificada pelo gene *cysS*) (TAUCH et al, 1999). É possível observar na **Figura 15**, que a região de resistência à tetraciclina é bastante conservada entre todas as linhagens. O gene *tetB* em *C. urealyticum* e na estirpe 1954 apresenta uma possível inserção de 217 pb. O gene *tetA* apresenta dois fragmentos pois está no início e final de dois *contigs*. Na estirpe *C. jeikeium* K411 (Genbank nº CR931997) é possível observar o transposon Tn3598, com as IS1249 flanqueando a região de resistência à tetraciclina. Nas demais estirpes, a IS1249 aparece apenas adjacente ao *tetA*.

Figura 15 - Contextos genômicos da região dos genes tetAB das estirpes clínicas de *C. striatum* deste estudo semelhantes aos encontrados no plasmídeo pTP10 de *C. striatum* M82B e a cepa tipo de *C. urealyticum* DSM 7109. ph, proteína hipotética. Alinhamento das sequências realizado com o algoritmo Blastn no programa EasyFig.

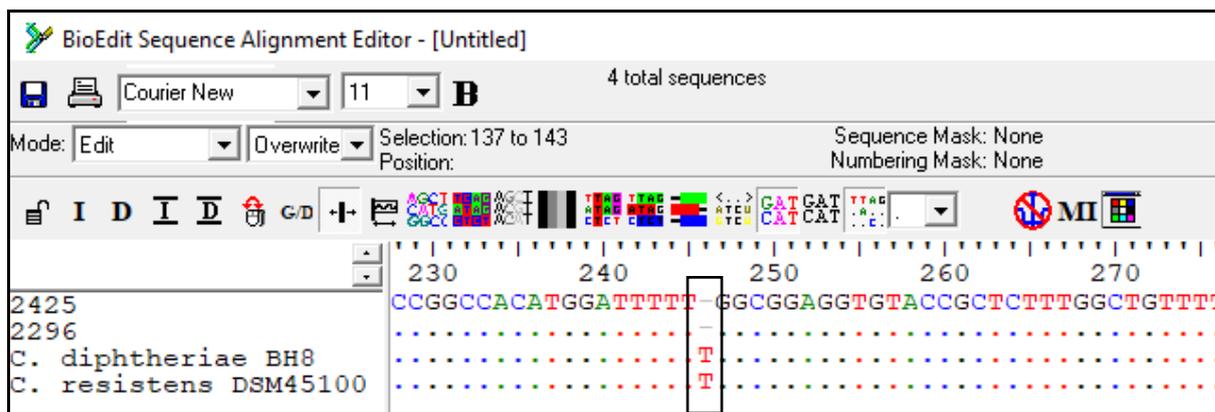


Fonte: (Da autora, 2018).

Além dos genes *tetAB*, em duas estirpes (2296 e 2425) localizamos o gene *tetW*, com tamanho de 1920 pb e cópia única em cada genoma. O *tetW* codifica uma proteína de proteção ao ribossomo, que reduz a suscetibilidade dos ribossomos às ações das tetraciclina. Este gene é encontrado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010).

As sequências do gene *tetW* de ambas as estirpes contem *gaps* que interrompem a tradução, resultando em proteínas de 521 aminoácidos, tamanho menor em 119 aminoácidos quando comparadas com as sequências de proteínas do *tetW* de *C. resistens* DSM 45100 (Genbank nº CP002857) e da estirpe brasileira de *C. diphtheriae* BH8, ambas com 639 aminoácidos. Para verificar se esses *gaps* encontrados em nossas sequências de *tetW* são verdadeiros, oligonucleotídeos foram desenhados e a região amplificada foi sequenciada pela metodologia de Sanger na plataforma do IOC/Fiocruz. As sequências foram editadas e analisadas. Os *gaps* localizam-se numa região rica em T (timina) e foram evidenciados pelo sequenciamento de Sanger. O alinhamento local destas sequências no algoritmo *Blast*/NCBI mostrou 99,89% de similaridade com as sequências do gene *tetW* da estirpe brasileira de *C. diphtheriae* BH8 e com a cepa tipo de *C. resistens* DSM 45100, além de diversas outras espécies bacterianas. As nossas estirpes apresentam uma deleção de timina na posição 246 (**Figura 16**), ocasionando mutações do tipo *frameshift*, que inviabiliza a expressão do produto gênico. Este pode ser o motivo pelo qual o gene *tetW* não levou a resistência em nossas estirpes.

Figura 16 - Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *tetW* das estirpes 2296 e 2425 com a estirpe brasileira *C. diphtheriae* BH8 e a cepa tipo *C. resistens* DSM 45100. Em destaque a deleção da timina na posição 246 nas estirpes 2296 e 2425. Alinhamento obtido pelo *Clustal W* usando o programa *Bioedit*.



Fonte: (Da autora, 2018).

Em *C. resistens* DSM 45100, o gene *tetW* foi localizado no plasmídeo pJA144188. Estudos experimentais confirmaram que este gene foi o responsável pelo fenótipo resistente à segunda geração de tetraciclinas em *C. resistens* (SCHRODER et al, 2012). Já a estirpe brasileira de *C. diphtheriae* BH8, pertencente ao LDCIC/UERJ e depositada na CBAS/Fiocruz, foi cultivada em ágar sangue a 37°C/48h e realizamos o teste de suscetibilidade à tetraciclina por difusão em gradiente de concentração, conforme protocolo descrito anteriormente. O resultado da CIM foi de >256 mg/L, qualificando-a como fenótipo resistente à tetraciclina, de acordo com os documentos M45-A2 (CLSI, 2010) e BrCAST (2017).

A resistência às tetraciclinas é comumente relatada em *C. striatum* (BRANDENBURG et al, 1996, CAMPANILE et al, 2009, GOMILA et al, 2012, RENOM et al, 2007), porém, pouco estudado é o mecanismo de resistência a estes antimicrobianos, sendo normalmente associado à detecção dos pares de genes *tetAB*, que expressam uma potente bomba de efluxo. Martinez-Martinez et al (1995) relacionaram a resistência às tetraciclinas à presença do gene *tetM* em 97% das estirpes de *C. striatum*. Esse gene codifica uma proteína de proteção ao ribossomo. Em todas as estirpes deste estudo, os pares de genes *tetAB* foram localizados. Na maioria delas, a IS1249 estava associada ao gene *tetA* e apresentou 100% de identidade com as sequências da IS1249 da estirpe *C. striatum* M82B e da cepa tipo de *C. urealyticum* DSM 7109, com fenótipos de resistência à tetraciclina. Esta IS e o gene *ybhB* são importantes para a expressão dos genes (TAUCH et al, 1999).

4.7.4 Resistência aos beta-lactâmicos

A resistência aos beta-lactâmicos em corinebactérias é muito relatada, especialmente em surtos nosocomiais por estirpes multirresistentes de *C. striatum* (ALIBI et al, 2017, BAIIO et al, 2013, WANG et al, 2016). Em nosso estudo, oito das dez estirpes com genomas sequenciados foram classificadas como multirresistentes e apresentaram susceptibilidade variada às penicilinas, às cefalosporinas e aos carbapenêmicos, conforme mostrado na **Tabela 18**.

Tabela 18 - Resultados das CIM dos diferentes beta-lactâmicos testados por difusão em gradiente de concentração para *C. striatum*. Interpretação dos resultados de acordo com os pontos de corte obtidos no documento M45-A2 do CLSI (2010).

Classe antimicrobiana	Agente antimicrobiano	CIM (mg/L)			Estirpes clínicas										Cepa tipo
		S ≤	I	R ≥	1954	1961	2023	2038	2130	2230	2237	2296	2308	2425	ATCC 6940
PENICILINAS	Penicilina ¹	0,12	0,25	2	0.12	0.03	>256	>256	0.5	3	3	0.5	>256	0.12	0.25
	Oxacilina ²	2	-	4	1.0	0.094	>256	>256	1.5	16	24	2-3	>256	0.38	4
	Ampicilina ²	8	-	16	0.19	0.016	>256	32	0.38	2-3	2	0.5	>256	0.032	0.064
CEFALOSPORINAS	Cefepima (4ª Geração)	1	2	4	1.0	NR	>256	>256	0.75	>256	12	2	>256	1.0	NR
	Cefotaxima (3ª Geração)	1	2	4	0.125	0.19	>256	>256	1.0	>256	8	2	>256	0.032	0.38
	Ceftriaxona (3ª Geração)	1	2	4	3	0.064	>256	>256	2	12-16	12-16	4-6	>256	2	2
CARBAPENÊMICOS	Imipenem	4	8	16	0.015	0.008	>32	>32	0.06	>32	>32	0.25	>32	0.06	0.03
	Meropenem	4	8	16	0.094	0.047	>32	>32	0.064	>32	>32	0.25	>32	0.125	0.047

As cores verde, azul e amarelo indicam fenótipos sensíveis, intermediário e resistentes aos beta-lactâmicos, respectivamente. S, sensível; I, intermediário; R, resistente; CIM, concentração inibitória mínima; NR, não realizado

¹ pontos de corte atualizados no documento CLSI M45-A3 (2016)

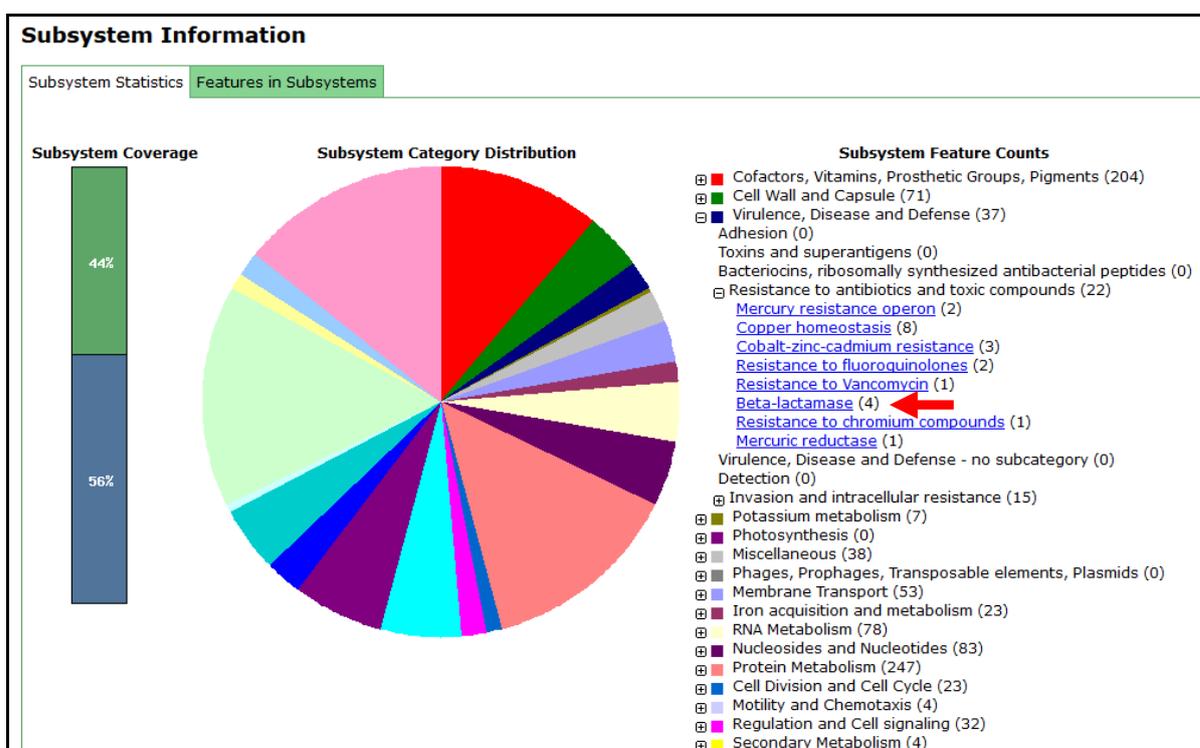
² Devido à ausência de pontos de corte para corinebactérias, foram utilizados os pontos de corte de *Staphylococcus* spp. para os antimicrobianos oxacilina e ampicilina.

Fonte: (Da autora, 2018).

As estirpes 1954, 2130 e 2425 (pulsotipos IV, V e IX, respectivamente) apresentaram susceptibilidade intermediária à ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, e sensibilidade a todos os outros beta-lactâmicos testados. As estirpes 2023, 2308 (ambas do pulsotipo I) e a estirpe 2038 (pulsotipo II) apresentaram resistência a todos os beta-lactâmicos testados. Já as estirpes 2230 e 2237 (mesmo paciente e pulsotipo VI) apresentaram resistência a todas as cefalosporinas e aos carbapenêmicos, e susceptibilidade variadas às penicilinas (**Tabela 18**).

Buscamos por genes associados à resistência aos beta-lactâmicos e nenhum gene foi localizado nos três bancos de dados de genes de resistência utilizados neste estudo. No entanto, a anotação automática dos genomas realizada no servidor *RAST* identificou alguns possíveis genes associados à resistência aos beta-lactâmicos, conforme mostrado na **Figura 17**.

Figura 17 – Mapa da distribuição das categorias em subsistemas da anotação automática pelo servidor *RAST*. Na categoria resistência aos antibióticos e compostos tóxicos é possível observar a anotação de quatro genes de beta-lactamases (seta vermelha).



Fonte: (Da autora, 2018).

Os genes anotados como beta-lactamases não-funcionais pelo servidor *RAST* foram: *BL*, beta lactamase; *BLc*, beta lactamase classe C; *BLR*, regulador negativo da expressão da

beta-lactamase; *bl*, beta lactamase e *BLIII*, hidrolase dependente de metal da superfamília III de beta lactamases. Associamos estes genes com os fenótipos obtidos neste estudo e em nenhum deles houve uma correlação.

A hidrólise dos antimicrobianos beta-lactâmicos pelas enzimas beta-lactamases é o mecanismo mais comum de resistência para esta classe de antimicrobianos. Estas enzimas são classificadas pela sequência de proteínas em 4 classes moleculares (A, B, C e D) baseadas nos motivos conservados dos aminoácidos (BUSH, 2013). Os estudos sobre os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em corinebactérias são bastante escassos. Em 2017, estudos realizados num hospital da Tunísia, os pesquisadores associaram a resistência aos antimicrobianos cefotaxime e penicilina à presença do gene *ampC*, codificando uma enzima da classe C das beta-lactmases. Além do gene *ampC*, foi encontrado o gene *bla*, que codifica uma serina hidrolase pertencente à classe A das beta-lactamases e este foi associado à resistência da penicilina também. No entanto, algumas estirpes resistentes às penicilinas e às cefalosporinas não carregavam nenhum dos genes (ALIBI et al, 2017).

Este gene *ampC* é o mesmo gene *bl* anotado pelo *RAST* e foi encontrado em todas as estirpes deste estudo. Assim como nas estirpes do estudo da Tunísia (ALIBI et al, 2017), nossas estirpes *ampC*-positivas apresentaram fenótipos variados às penicilinas e às cefalosporinas e não pôde ser associado apenas com a presença deste gene nos genomas. Além disso, nenhuma mutação nas proteínas codificadas por estes genes pôde ser relacionada às estirpes resistentes (dados não mostrados).

Além do gene *ampC*, encontramos o gene *bla* em sete estirpes. Este é o gene *BL* anotado pelo servidor *RAST* (**Tabela 19**). Assim como ocorreu com o gene *ampC* em nossas estirpes, não foi possível relacionar os fenótipos apenas à presença do gene *bla*, nem com mutações ou alterações nas sequências protéicas das estirpes resistentes e sensíveis.

Um dado consistente e observado em nossos estudos, é que as estirpes *bla*-positivas (2023, 2038 e 2308) que não possuem o gene *BLR* (**Tabela 19**), regulador negativo da expressão da beta-lactamase, apresentaram resistência a todos os beta-lactâmicos testados, com CIM superiores a 256 mg/L à todas as penicilinas e cefalosporinas, e CIM superiores a 32 mg/L para os carbapanêmicos (**Tabela 18**). Já as estirpes 2130, 2230, 2237 e 2296, *bla*-positivas e *BLR*-positivas, apresentaram CIM variadas a todos os beta-lactâmicos (**Tabela 18**). A estirpe 2130 apresenta uma terceira cópia do *BLR* que não alinha com os *BLR* encontrados nas demais estirpes. Isto pode estar envolvido aos baixos níveis de CIM aos antimicrobianos beta-lactâmicos nesta estirpe, quando se compara com as CIM das demais estirpes que apresentam duas cópias do *BLR*. Esta possível relação do gene *bla* e a expressão

do regulador BLR nunca antes foi documentada e necessita de estudos experimentais futuros para comprovar esta hipótese.

Tabela 19 - Genes BLR e *bla* (BL) encontrados nas estirpes deste estudo

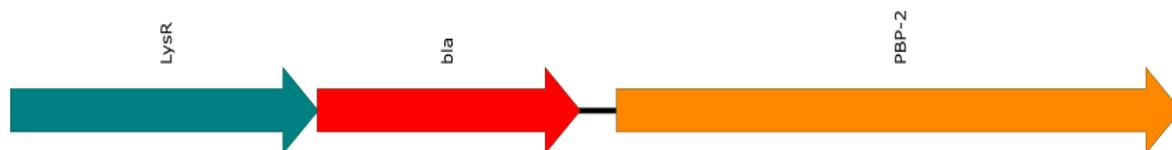
Estirpes	BLR	<i>bla</i> (BL)
1954	-	-
1961	-	-
2425	+ (2)	-
2023	-	+
2038	-	+
2308	-	+
2130	+ (3)	+
2230	+ (2)	+ (2)
2237	+ (2)	+
2296	+ (2)	+

+ presença; - ausência. O número entre parênteses indica a quantidade de cópias encontradas nos genomas.

Fonte: (Da autora, 2018).

Observamos que nas sete estirpes, o contexto genômico em que o gene *bla* encontra-se inserido é o mesmo (**Figura 18**). Adjacente a ele encontra-se o regulador transcricional da família LysR, que funciona como um regulador positivo para a expressão do gene *blaB* para beta-lactamase e uma variedade de genes, incluindo aqueles envolvidos em funções relacionadas à virulência, mobilidade e metabolismo (SHEEHAN et al, 2015). Subjacente ao gene *bla*, encontra-se uma PBP-2, com domínio de transpeptidase, altamente conservada nas setes estirpes, com um aminoácido diferente na posição 82 da estirpe 2130 (mutação de isoleucina para treonina).

Figura 18 – Contexto genômico do gene *bla* encontrado nas estirpes. LysR, regulador transcricional da família LysR; *bla*, beta-lactamase A; PBP-2, proteína de ligação às penicilinas.



Fonte: (Da autora, 2018).

A busca por alterações de PBP associadas à resistência aos beta-lactâmicos em *C. resistens* DSM 45100, *C. glutamicum* ATCC 13042 e *C. jeikeium* K411 (LAVOLLAY et al, 2009, SCHRODER et al, 2012, VALBUENA et al, 2007) foi realizada. Alterações nas PBP relatadas nessas espécies não foram encontradas nas estirpes deste estudo.

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem e ertapenem) têm um amplo espectro de atividade e são relativamente estáveis à hidrólise pela maioria das beta-lactamases. Mas as metalobeta-lactamases (MBL) são capazes de hidrolisar eficientemente todos os beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Essas enzimas, que pertencem à classe B da classificação estrutural das beta-lactamases, exigem cátions divalentes, geralmente zinco, como cofatores de metais para atividade enzimática e são inibidos por quelantes de metais, como o etilenodiamina tetra acético (EDTA). Em algumas bactérias, as MBL são codificadas por genes que fazem parte do cromossomo ou por genes heterólogos adquiridos por transferência de elementos genéticos móveis (BRANDT et al, 2017, BUSH, 2013, SHEIKH et al, 2014). Outro mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é a expressão dos sistemas de efluxo. Em *P. aeruginosa*, estes sistemas pertencem à família *resistance nodulation cell division* (RND) e permitem a remoção de moléculas para o exterior celular a partir de aberturas de um canal que atravessa as membranas interna e externa da bactéria (ARABESTANI et al, 2015).

A resistência ao imipenem em estirpes de *C. striatum* tem sido relatada em alguns países, como o Japão (OTSUKA et al, 2006), a Espanha (GOMILA et al, 2012, RENOM et al, 2014) e a Itália (CAMPANILE et al, 2009), mas nenhum mecanismo de resistência aos carbapenêmicos foi descrito ainda. Em nossas estirpes inicialmente estudadas, 14 das 21 estirpes (66,7%) foram resistentes ao imipenem. Das 10 estirpes com genomas sequenciados, cinco mostraram resistência ao imipenem e meropenem, com CIM superiores a 32 mg/L. Esses dados indicam que a terapia combinada que inclui o imipenem para o tratamento de infecções por *C. striatum* multirresistente no Brasil deve ser mais prudente.

O gene *BLIII* anotado pelo servidor *RAST*, que codifica a hidrolase dependente de metal da superfamília III de beta lactamases, foi encontrado nas dez estirpes e também não pôde ser associado ao fenótipo resistente, já que as estirpes sensíveis aos carbapenêmicos carregam este genes.

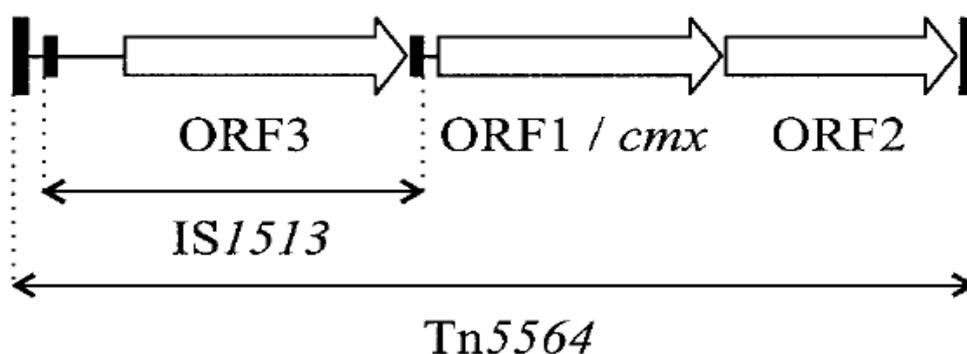
Nos três bancos de dados de genes de resistência aqui analisados, usando limites de busca de 30% para as sequências nucleotídicas e proteicas, não conseguimos encontrar nenhuma MBL que pudesse ser associada aos fenótipos resistentes. Realizamos uma nova pesquisa por beta-lactamases usando as sequências de proteínas do banco de dados do NCBI,

Beta-lactamase Data Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>) e nenhum gene de beta-lactamase foi localizado em nossos genomas. Além dessas pesquisas, buscamos por homólogos de bombas de efluxo, como MexAB-OprM, um dos maiores sistemas de efluxo encontrado em *P. aeruginosa* (ARABESTANI et al, 2015), cujas sequências encontram-se depositadas no banco de dados *Antibiotic Resistance Genes Database* (LIU; POP, 2009), pertencentes à superfamília RND, anteriormente descrita e nenhum gene relacionado foi encontrado em nossas estirpes.

4.7.5 Resistência ao cloranfenicol

O gene *cmx*, responsável pela resistência ao cloranfenicol nas corinebactérias, foi primeiramente descrito como parte do segmento III do plasmídeo pTP10 em *C. striatum*, inserido no transposon Tn5564. Este transposon é constituído pela ORF 1, codificante de uma proteína de efluxo transmembrana do cloranfenicol; ORF 2, homóloga à transposase da IS5564, identificada em *P. nicotinovorans* e *Bordetella pertussis*, conforme mostrado na **Figura 19** (TAUCH et al, 1998).

Figura 19 - Organização genética do transposon Tn5564, da estirpe de *C. striatum* M82B, sendo a ORF2 a sequência codificante da transposase 5564.



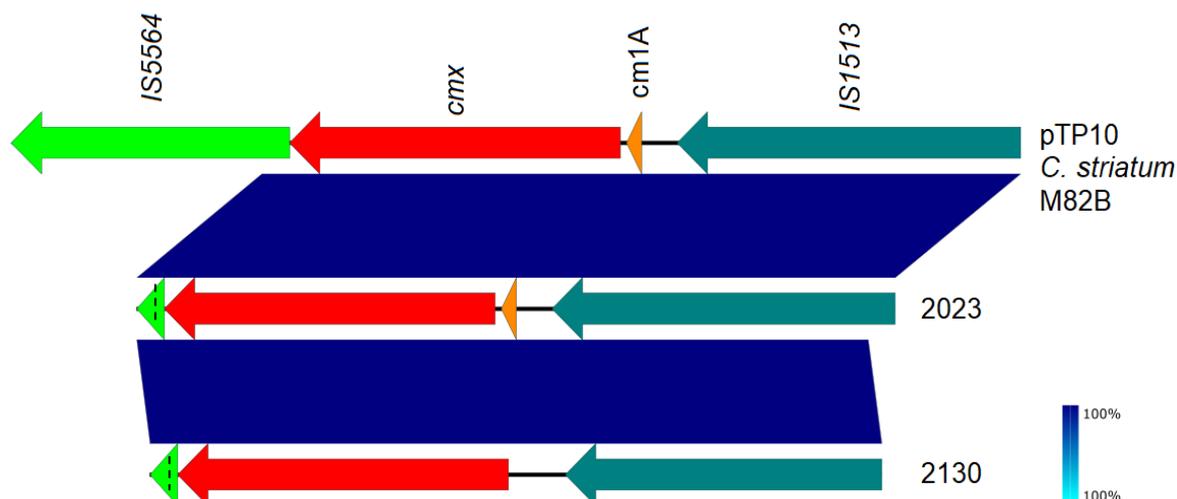
Fonte: (TAUCH et al, 1998).

Neste estudo, investigamos a presença do gene *cmx* por PCR nas 21 estirpes inicialmente trabalhadas antes do sequenciamento dos genomas (**Tabela 5**). O gene *cmx* não foi amplificado apenas na estirpe 2376, a única com fenótipo sensível ao cloranfenicol pelo método de disco-difusão (**ANEXO A**). Nas estirpes que tiveram o genoma sequenciado, o gene *cmx* não foi encontrado apenas nas estirpes 1954, 1961 e na cepa tipo de *C. striatum*

ATCC 6940, que apresentaram fenótipos sensíveis ao cloranfenicol. A susceptibilidade ao disco de cloranfenicol (30 µg) foi testada utilizando os pontos de corte de *Staphylococcus* spp., definidos pelo documento BrCAST (2017), devido à ausência de pontos de corte deste antimicrobiano para as corinebactérias.

O gene *cmx*, com tamanho de 1176 pb, apresentou contextos genômicos distintos nos oito genomas em que foi encontrado, incluindo entre as estirpes do mesmo pulsotipo. Os genes *cmx* encontrados nas estirpes 2023 e 2130 estão dentro do transposon Tn5564, com as IS1513 e IS5564 flanqueando o gene *cmx*. Este gene nas estirpes 2023 e 2130 alinha com 100% de identidade uma região de 2696 pb com o Tn5564 (tamanho 3.587 pb) encontrado no plasmídeo pTP10 de *C. striatum* M82B, uma vez que a IS5564 encontra-se incompleta em nossas estirpes. O Tn5564 da estirpe 2130 não carrega o *cm1A* (*leader peptide*), o que sugere que este pode ter sofrido um rearranjo (**Figura 20**).

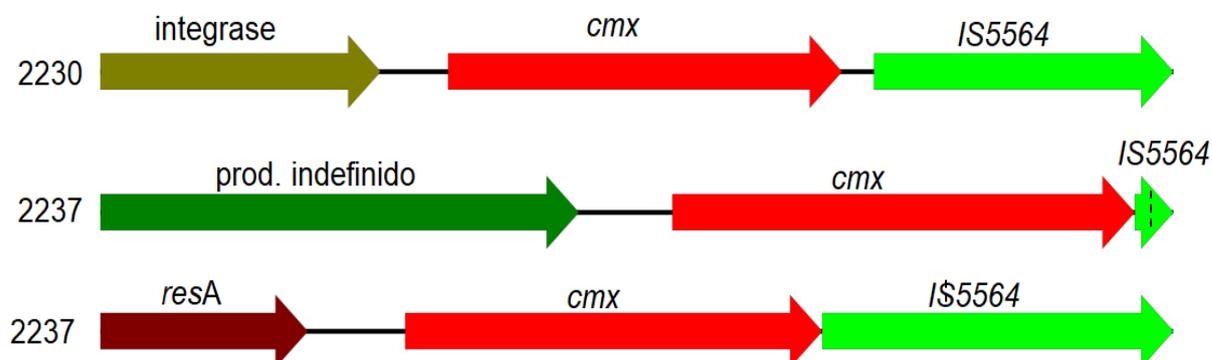
Figura 20 – Comparação entre os Tn5564 encontrado no plasmídeo pTP10 de *C. striatum* M82B com as estirpes 2023 e 2130 deste estudo. Os traços internos da IS5564 das estirpes 2023 e 2130 indicam que estão incompletas (não estão localizadas no fim ou início do *contig*). Figura gerada a partir do alinhamento local (*Blastn*) das 3 estirpes obtida no programa *EasyFig* (SULLIVAN; PETTY; BEATSON, 2011).



Fonte: (Da autora, 2018).

É importante ressaltar que as estirpes 2230 e 2237, do mesmo paciente e pulsotipo, apresentaram número de cópias deste gene diferente (**Figura 21**). A estirpe 2237 tem duas cópias do gene *cmx* em diferentes regiões dos genomas com contextos genômicos distintos da estirpe 2230.

Figura 21 – Contexto genômico do gene *cmx* nas estirpes 2230 e 2237, do mesmo paciente e pulstotipo. Os traços internos da IS5564 indicam que estas sequências estão incompletas (não estão localizadas no início ou fim do *contig*). *resA*, gene codificante da resolvase A; prod. indefinido, produto indefinido.

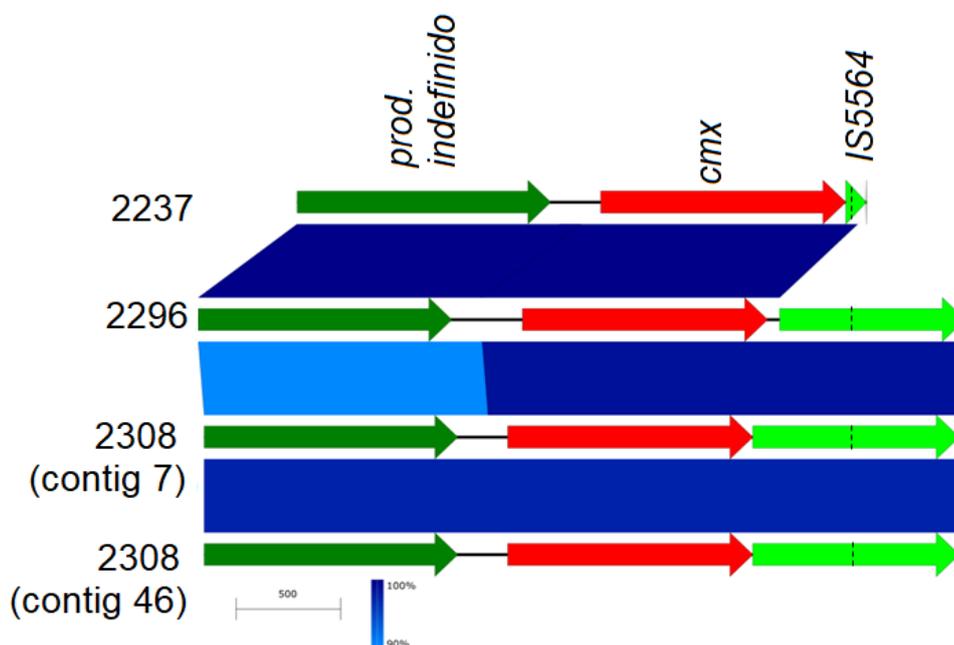


Fonte: (Da autora, 2018).

As duas cópias do gene *cmx* nas estirpes 2237 apresentaram contextos genômicos distintos (**Figura 21**). Ambas possuem as IS5564 incompletas subjacentes ao gene *cmx*, mas em uma delas, adjacente ao gene *cmx* um gene anotado como produto indefinido pelo NCBI, de 1217 pb e 97% de identidade com a transposase da família IS3, encontrada nos genomas de *C. striatum* Kc-Na-01 (Coréia do Sul), 215 e 216 (estirpes clínicas multirresistentes dos EUA) e 95% de identidade com a mesma transposase na estirpe *C. aurimucosum* ATCC 700975.

Nas estirpes 2237, 2296 e 2308, a região em que o gene *cmx* encontra-se tem a mesma organização genética (**Figura 22**). Em todos eles a IS5564 incompleta encontra-se adjacente ao gene *cmx*. Nas estirpes 2296 e 2308 (*contig* 46), a IS5564 encontra-se localizada no final e início do *contig*, respectivamente. A estirpe 2308 tem duas cópias do gene *cmx* em regiões distintas do genoma, mas apresentaram a mesma organização. No *contig* 46, adjacente à região do *cmx* encontra-se uma região repetitiva de CRISPR, de 1188 pb.

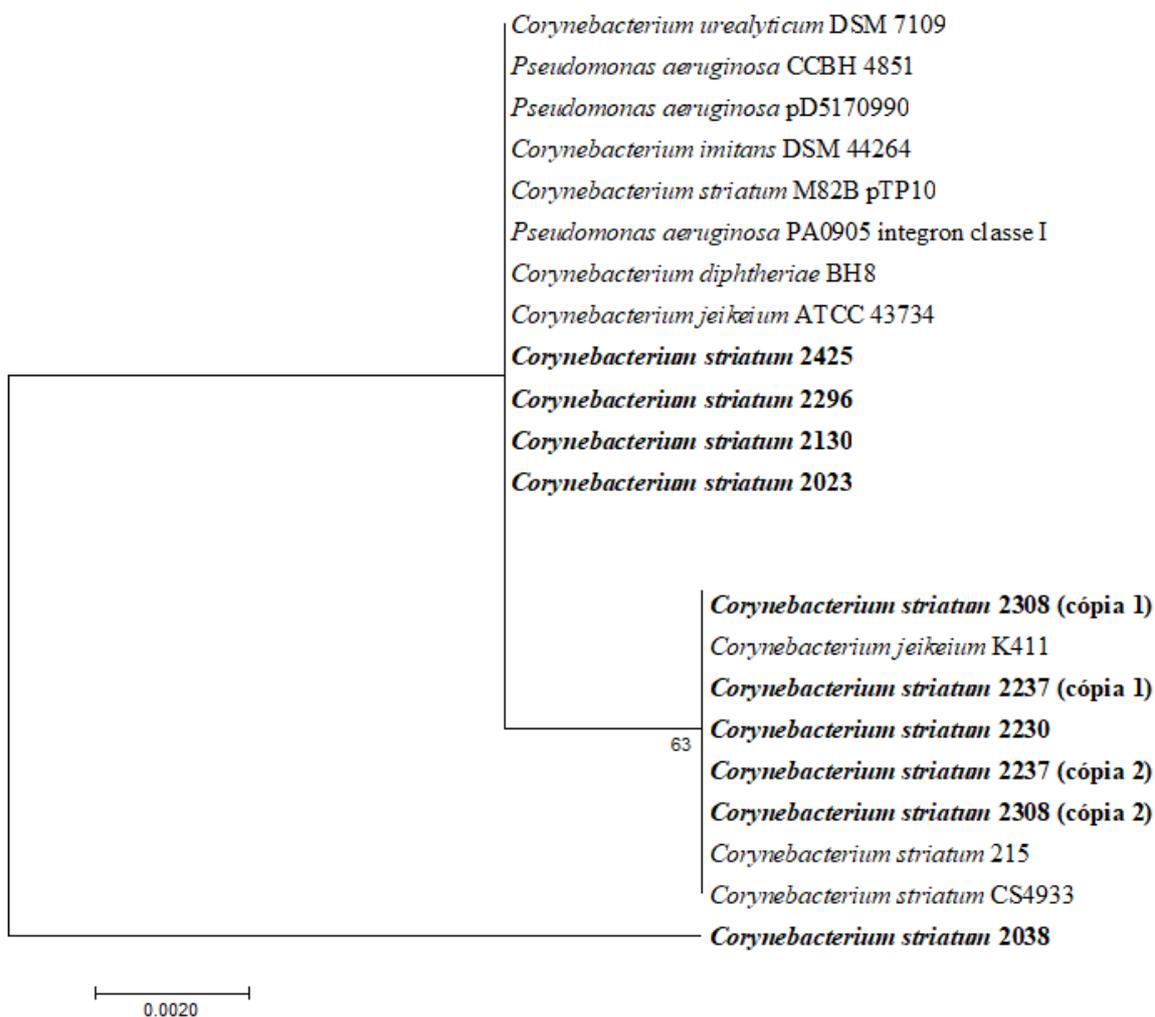
Figura 22 – Contexto genômico do gene *cmx* nas estirpes 2237, 2296 e 2308. Os traços internos da *IS5564* indicam que estão incompletas. Nas estirpes 2296 e 2308 (*contig 46*), a *IS5564* encontra-se localizada no final e início do *contig*, respectivamente. Figura gerada a partir do alinhamento local (*Blastn*) das 3 estirpes obtida no programa *EasyFig* (SULLIVAN; PETTY; BEATSON, 2011).



Fonte: (Da autora, 2018).

A análise filogenética do gene *cmx* mostrou o agrupamento das sequências de aminoácidos em 3 clados diferentes (**Figura 23**), todos conferindo resistência ao cloranfenicol. Num clado, as sequências de proteínas apresentam 100% de similaridade com as sequências de *C. striatum* de outros países, como Estados Unidos (*C. striatum* 215) e Espanha (*C. striatum* CS4933). Em outro grupo, as sequências das estirpes 2023, 2130, 2296 e 2425 alinharam com 100% de similaridade com as sequências das cepas tipo de *C. jeikeium* ATCC 43734 e *C. urealyticum* DSM 7109 (ambas resistentes ao cloranfenicol) e com a estirpe de *P. aeruginosa* PA0905 (resistente ao cloranfenicol).

Figura 23 - Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene *cmx* (386 posições) utilizando o método de *Neighbor-Joining* (p-distance). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,002% de divergência. Para a construção desta árvore filogenética foram utilizadas as sequências de aminoácidos do gene *cmx* de diversas espécies de corinebactérias e outras espécies que apresentaram alta similaridade com as sequências das estirpes de *C. striatum* deste estudo, destacadas em negrito.



Fonte: (Da autora, 2018).

O gene *cmx* é responsável por codificar uma proteína de efluxo do cloranfenicol e tem sido encontrado em transposons, plasmídeos e genomas de diversas espécies de *Corynebacterium* (SCHRODER et al, 2012, MOLLMANN et al, 2014, TAUCH et al, 2008). Exceto na estirpe 2425, em que o gene *cmx* está flanqueado por duas proteínas hipotéticas, nas demais a IS5564 estava sempre associada ao gene *cmx*. A associação da IS5564 indica que o Tn5564 pode ter sofrido um rearranjo genômico. Contudo, em duas estirpes (2023 e 2130 - pulsotipos I e V, respectivamente), o gene *cmx* foi localizado inserido no transposon Tn5564, integrado nos cromossomos (**Figura 20**). Em todas as estirpes o gene *cmx* foi localizado

inserido nos cromossomos. Embora com contextos genômicos e alelos distintos (mesmo entre as estirpes do pulsotipo I, 2023 e 2308), todas as estirpes apresentaram fenótipos de resistência ao cloranfenicol.

Poucos estudos relataram a resistência ao cloranfenicol em corinebactérias, uma vez que este antimicrobiano não é utilizado no tratamento sistêmico de infecções causadas por estes micro-organismos. Ubaldi et al (2004) relataram que 61,0% das estirpes de *Corynebacterium* spp., incluindo *C. striatum*, isoladas de infecções hospitalares apresentaram o fenótipo de resistência ao cloranfenicol. Outro estudo sobre infecções de feridas de pele causadas por *Corynebacterium* spp., incluindo *C. striatum*, mostrou a presença de 71,7% das estirpes resistentes ao cloranfenicol (OLENDER; LETOWSKA, 2010). Olender (2013) mostrou que a resistência ao MLSB está relacionada com o fenótipo de resistência ao cloranfenicol, à tetraciclina e ao sulfametoxazol em estirpes isoladas do trato respiratório. Por outro lado, Das et al (2016) mostraram que corinebactérias, incluindo a espécie *C. striatum*, foram importantes agentes infecciosos de ceratite ocular na Índia, sendo o cloranfenicol um dos antimicrobianos utilizados para o tratamento destas infecções. Neste estudo foi encontrada resistência de 40,10% ao cloranfenicol entre as corinebactérias com genomas sequenciados.

4.7.6 Resistência aos aminoglicosídeos

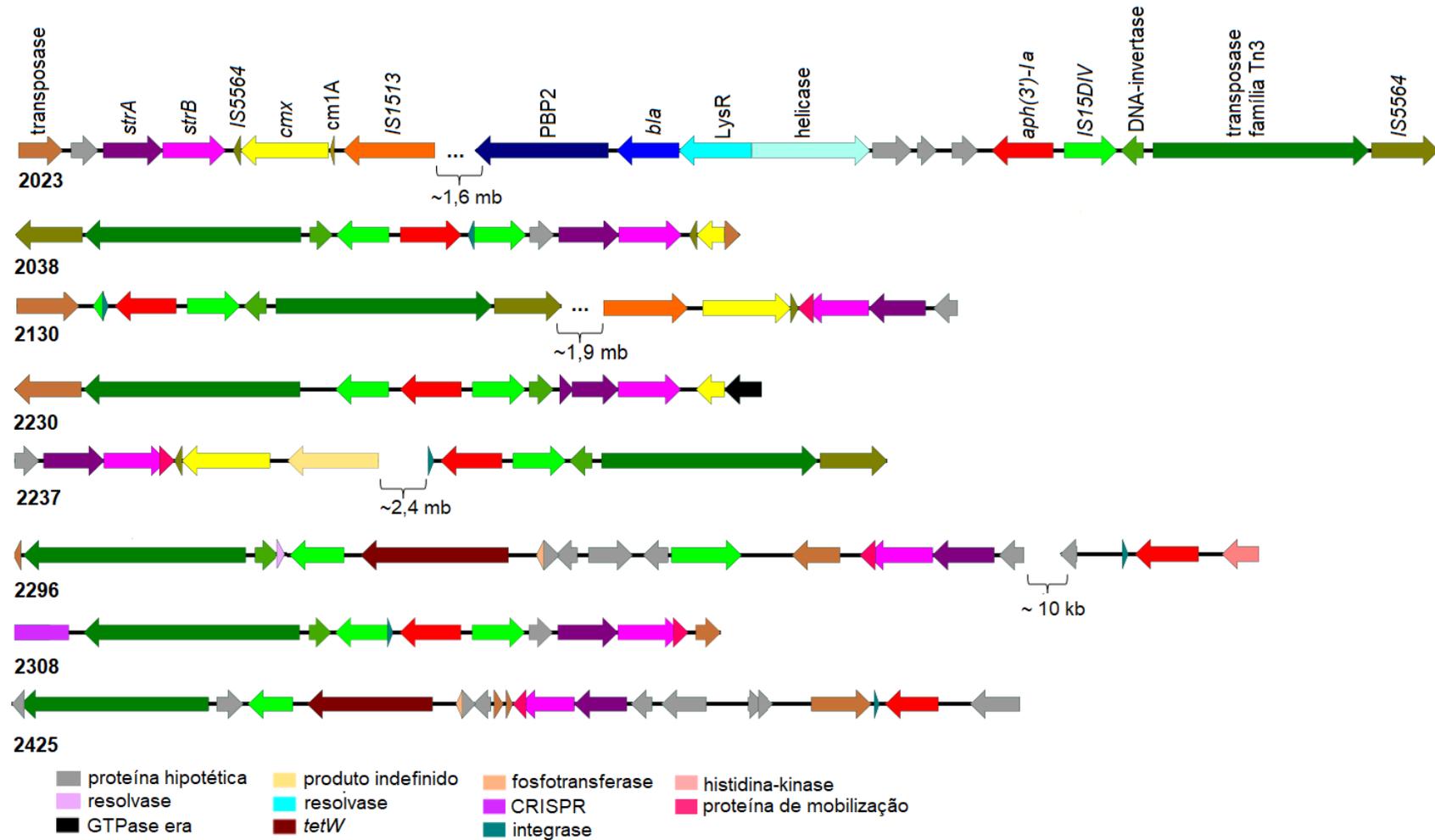
Os aminoglicosídeos constituem a segunda linha de tratamento ou antimicrobianos complementares usados para o tratamento de infecções causadas por corinebactérias. O mecanismo mais prevalente de resistência aos aminoglicosídeos em corinebactérias é por inativação por modificação enzimática (NAVAS et al, 2016). Anteriormente ao sequenciamento dos genomas, as 21 estirpes de *C. striatum* inicialmente estudadas foram submetidas à pesquisa por PCR do gene *aphA*, associado à resistência aos aminoglicosídeos. Este gene codifica a enzima fosfotransferase que inativa os aminoglicosídeos por modificação enzimática (SHI et al, 2013). Inicialmente, um amplicon foi purificado, sequenciado, analisado e utilizado como controle-positivo para as demais reações de PCR. Amplificamos o gene *aphA* em 20 das 21 estirpes. Apenas a estirpe 2376, isolada de neonato, foi *aphA*-negativa. Até àquele momento, apenas a gentamicina havia sido testada, pelo método de disco-difusão. A estirpe 2376 (*aphA*-negativa) foi sensível à gentamicina e duas estirpes (2130 e 2425) *aph*-positivas foram sensíveis à gentamicina, o que levou-nos a pensar que estas estirpes poderiam ter mutações afetando o gene *aphA* ou a sua região promotora.

A partir do sequenciamento de alta vazão de dez estirpes foi possível conhecer o contexto genômico dos genes de resistência aos aminoglicosídeos e investigar sobre seus mecanismos de resistência. Submetemos os genomas, incluindo o da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 aos bancos de dados de genes de resistência. No banco de dados *Resfinder*, buscamos por mutações associadas à resistência aos aminoglicosídeos em *M. tuberculosis*, a espécie mais próxima filogeneticamente ao *C. striatum* depositada no banco de dados.

Encontramos os genes *strA-strB*, também denominados *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*, respectivamente, que conferem resistência à estreptomicina e o gene *aph(3')-Ia*, que confere resistência à kanamicina, à gentamicina, à neomicina, à ribostamicina, à paromicina e à lividomicina (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010, SHI et al, 2013). Além destes genes, mutações nas posições 799 e 1406 do gene 16S rRNA foram encontradas relacionadas à resistência aos aminoglicosídeos em *M. tuberculosis* (SANDGREN et al, 2009). Tais genes foram encontrados nas estirpes deste estudo, exceto em 1954, 1961 e na cepa tipo *C. striatum* ATCC 6940, com fenótipos de sensibilidade aos aminoglicosídeos (**Tabela 12**)

Como nos demais genes de resistência anteriormente discutidos, os genes de resistência aos aminoglicosídeos apresentaram contextos genômicos distintos, mesmo entre as estirpes do mesmo pulsotipo (**Figura 24**).

Figura 24 – Contexto genômico dos genes *aph(3')-Ia*, *strA* e *strB*, envolvidos na resistência aos aminoglicosídeos nas oito estirpes multirresistentes de *C. striatum*.



Fonte: (Da autora, 2018).

Em cinco estirpes (2023, 2038, 2130, 2230 e 2237), os genes *strA* (837 pb) e *strB* (840 pb) estão localizados próximos à região de resistência ao cloranfenicol (gene *cmx*). Nas demais estirpes (2296, 2308 e 2425), adjacente aos genes *strA-strB* encontra-se o gene incompleto codificante da proteína putativa de mobilização e uma transposase ainda não descrita pertencente à família 256. A referida transposase contém diversas sequências de inserção presentes em cromossomos e transposons de diversas espécies de corinebactérias e encontradas também em *Actinomyces turicensis*. Observamos que os genes *strA-strB* são altamente conservados e apresentam 100% de similaridade entre si e com os genes encontrados em outros gêneros bacterianos, como *Salmonella enterica*, *Vibrio alginolyticus*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* e outros, sugerindo uma possível transferência lateral destes pares de genes, hipótese reforçada pela proximidade à diversos elementos genéticos móveis.

O banco de dados *Resfinder* encontrou mutações associadas à resistência à estreptomicina em *M. tuberculosis* na posição 799 do gene 16S rRNA das nossas estirpes resistentes à estreptomicina, que carregam os genes *strA-strB*. Recuperamos o gene 16S rRNA dos nossos genomas usando o servidor *RNAmmmer* 1.2 (LAGESEN et al, 2007), que faz predição dos genes ribossomais (5S, 23S e 16S). Esta mutação foi observada em oito estirpes, ocasionando na mudança de citosina para tirosina. Entretanto, as estirpes sensíveis à estreptomicina 1954, 1961 e a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 não apresentaram esta mutação (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Relação entre a mutação na posição 799 do operon ribossomal 16S com a presença dos genes *strA-strB* e o perfil de suscetibilidade à estreptomicina de dez estirpes desse estudo e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940.

Estirpes	Mutação na posição 799 do 16S rRNA (C → T)	Deteção dos genes <i>strA-strB</i>	Perfil de susceptibilidade à estreptomicina (10 µg)
1954	Sim	Não	Sensível
1961	Sim	Não	Sensível
2023	Sim	Sim	Resistente
2038	Sim	Sim	Resistente
2130	Sim	Sim	Resistente
2230	Sim	Sim	Resistente
2237	Sim	Sim	Resistente
2296	Sim	Sim	Resistente
2308	Sim	Sim	Resistente
2425	Sim	Sim	Resistente
Cepa tipo ATCC6940	Sim	Não	Sensível

Em amarelo as estirpes com mutações na posição 799 do gene 16S rRNA e carreadoras dos genes *strA-strB*, todas resistentes à estreptomicina.

Fonte: (Da autora, 2018).

O teste de susceptibilidade à estreptomicina (10 µg) pelo método de disco-difusão foi realizado conforme protocolo descrito anteriormente. Devido à ausência de pontos de corte para corinebactérias para este antimicrobiano, utilizamos os pontos de corte para enterobactérias definidos pelo documento M100S do CLSI (2016).

Não existe nenhuma correlação na literatura entre a mutação na posição 799 do operon ribossomal 16S e a presença do gene *strA-strB* em corinebactérias. Acreditamos que apenas a mutação na posição 799 não seja suficiente para expressar o fenótipo da resistência à estreptomicina, como ocorre em *M. tuberculosis* (SANDGREN et al, 2009), sendo necessário carrear os genes *strA-strB*.

O gene *aph(3')-Ia*, anteriormente amplificado por PCR em 20 das 21 estirpes, com tamanho de 816 pb, apresentou valores acima de 99,50% de identidade com as sequências nucleotídicas do gene *aph(3')-Ia* de outras corinebactérias, como *C. imitans* DSM 44264 (cepa tipo, resistente à kanamicina), *C. striatum* M82B (fenótipo de suscetibilidade aos aminoglicosídeos não informado), *C. urealyticum* DSM 7111 (resistente à gentamicina) e com outros gêneros bacterianos, como *Providencia stuartii* PsB3, *Pseudomonas putida* HB3267, resistentes à gentamicina e outros gêneros.

Nas estirpes 2038, 2130, 2230 e 2308, o gene *aph(3')-Ia* encontra-se flanqueado pela *IS15DIV*, isolada pela primeira vez no plasmídeo pBP11 de *Salmonella typhimurium* (NUCKEN; HENSCHKE; SCHMIDT, 1990). Já na estirpe 2230 (clone da estirpe 2237) e 2023 (clone da estirpe 2308), a *IS15DIV* encontra-se apenas subjacente ao gene *aph(3')-Ia* (**Figura 24**). Em todas as estirpes, a transposase da família Tn3 estava associada à região de resistência aos aminoglicosídeos. Esta transposase possui 977 aminoácidos e apresenta 99% de identidade com *C. striatum* e outras espécies, como *Salmonella enterica*, *P. putida*, *Acinetobacter radioresistens*, *Klebsiella pneumoniae*, entre outras. Esta transposase contém um domínio DUF4158, similar à transposase encontrada no transposon Tn3 de *E. coli* e mais 3 domínios com resíduos carboxilados que parecem ser os responsáveis por coordenar íons de metal que são necessários para a catálise. As transposases se ligam ao final do transposon e catalisam o movimento do transposon para outra parte do genoma (NESMELOVA; HACKETT, 2010).

Todas as estirpes e a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos gentamicina e amicacina para determinação da CIM por difusão em gradiente de concentração. As estirpes 2130 e 2425 foram sensíveis ao aminoglicosídeo gentamicina, apesar de possuírem o gene *aph(3')-Ia*. A correlação entre a presença do gene *aph(3')-Ia* e a CIM dos antimicrobianos gentamicina e amicacina nas

estirpes estudadas e na cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 encontradas nas estirpes é mostrada na **Tabela 21**.

Tabela 21 - Correlação entre a presença do gene *aph(3')-Ia* e a CIM dos antimicrobianos gentamicina e amicacina nas estirpes e na cepa tipo ATCC 6940.

Presença ou ausência do gene <i>aph(3')-Ia</i>	Estirpes	Agentes Antimicrobianos (CIM mg/L)	
		Gentamicina	Amicacina
<i>aph(3')-Ia</i> -positivas	2023, 2038, 2296	>1024	>256
	2230, 2237, 2308	>256	>256
	2130	0,12	0,25
	2425	0,12	0,125
<i>aph(3')-Ia</i> -negativas	1954	0,06	0,19
	1961	0,12	0,19
	ATCC 6940	<0,06	0,094

CIM, concentração inibitória mínima. Em destaque (negrito) as estirpes resistentes aos aminoglicosídeos conforme interpretação dos documentos do CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017)

Fonte: (Da autora, 2018).

Os documentos do CLSI M45-A2 (2010) e o BrCAST (2017) trazem apenas os pontos de corte para CIM para o antimicrobiano gentamicina. Foi observado que apesar dos pontos de corte para gentamicina em ambos os documentos serem muito discrepantes (**Tabela 22**), não ocorreu alterações dos perfis de susceptibilidade a este antimicrobiano. Os pontos de corte para CIM do antimicrobiano amicacina de *Staphylococcus* spp. foram utilizados e são apresentados na **Tabela 22**.

Tabela 22 - Pontos de corte para aminoglicosídeos descritos nos documentos CLSI M45-A2 (2010) e BrCAST (2017)

Agentes antimicrobianos	CLSI M45-A2			BrCAST		
	S ≤	I	R ≥	S ≤	I	R >
Gentamicina	4	8	16	1	-	1
Amicacina	16	32	64	8	16	16

S, sensível; I, intermediário; R, resistente. Devido à ausência de pontos de corte para corinebactérias para os antimicrobianos levofloxacino e moxifloxacino, utilizamos os pontos de corte para *Staphylococcus* spp. (em destaque) obtidos nos documentos do CLSI M100S (2016) e BrCAST (2017).

Fonte: (adaptado de BrCAST, 2017, CLSI, 2016).

As sequências nucleotídicas do gene *aph(3')-Ia* foram alinhadas. Notamos que as estirpes 2130 e 2425, *aph(3')-Ia*-positivas, sensíveis à gentamicina e à amicacina, apresentaram mutações nucleotídicas na mesma posição e que estas não alteraram a tradução para aminoácidos. O alinhamento das sequências de aminoácidos mostrou que as sequências de todas as estirpes são 100% idênticas. A busca por mutações no operon ribossomal 16S foi

relacionada e a correlação com a presença do gene *aph(3')-Ia* com os perfis de susceptibilidade aos aminoglicosídeos está mostrada na **Tabela 23**.

Tabela 23 - Relação entre a mutação na posição 1406 do operon ribossomal 16S e a presença do gene *aph(3')-Ia* e os perfis de suscetibilidade à gentamicina e amicacina de dez estirpes desse estudo e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940.

Estirpes	Mutação na posição 1406 do 16S rRNA (A → G)	Deteccção do gene <i>aph(3')-Ia</i>	Perfil de susceptibilidade à gentamicina e amicacina
1954	Não	Não	Sensível
1961	Não	Não	Sensível
2023	Sim	Sim	Resistente
2038	Sim	Sim	Resistente
2130	Não	Sim	Sensível
2230	Sim	Sim	Resistente
2237	Sim	Sim	Resistente
2296	Sim	Sim	Resistente
2308	Sim	Sim	Resistente
2425	Sim	Sim	Sensível
Cepa tipo ATCC6940	Não	Não	Sensível

Em amarelo a estirpe 2130, carreadora do gene *aph(3')-Ia* não apresenta mutação na posição 1406 do 16S rRNA, sensível à gentamicina e amicacina.

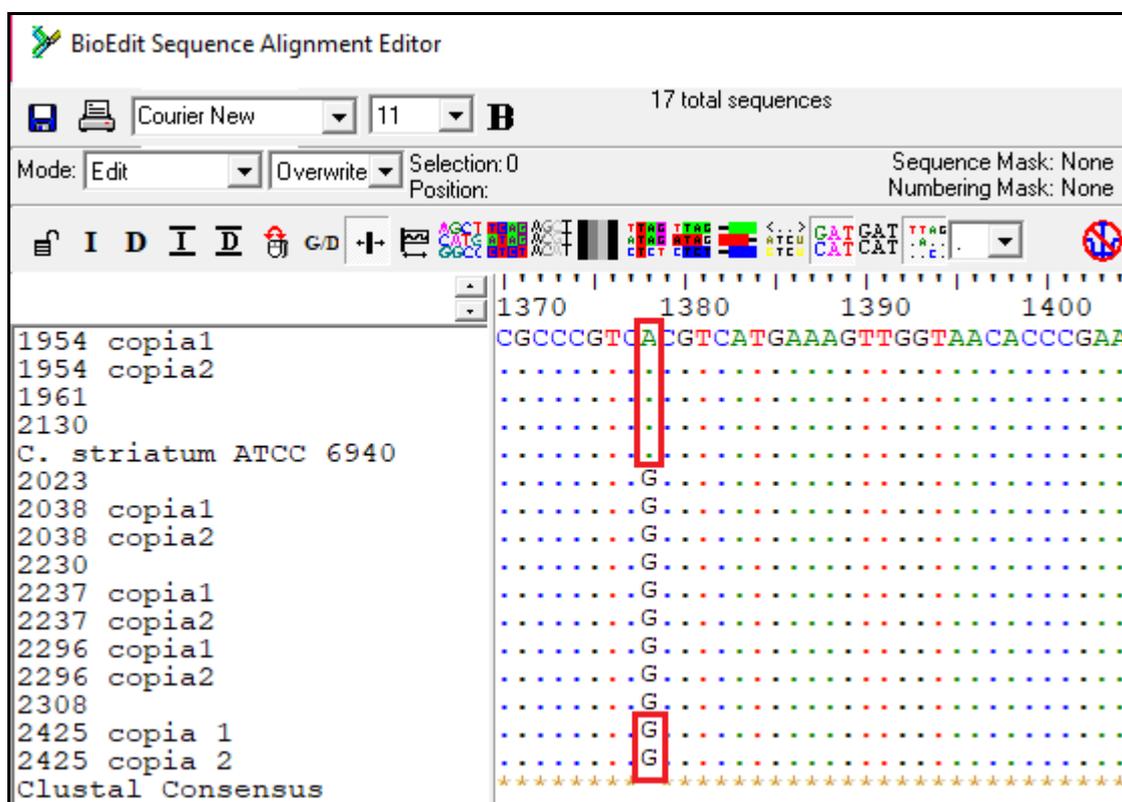
Fonte: (Da autora, 2018).

A resistência ao aminoglicosídeo amicacina em *M. tuberculosis*, gênero relacionado às corinebactérias, está associada à mutação na posição 1406 do gene 16S rRNA (substituição de adenina para guanina). Até o momento, não existe correlação de mutações na posição 1406 do operon ribossomal 16S com a presença do gene *aph(3')-Ia*, que codifica uma enzima modificante do aminoglicosídeo e é comumente adquirido por transferência lateral. Na literatura, encontramos apenas a correlação entre esta mutação e a resistência à amicacina, em *M. tuberculosis* (JNAWALI et al, 2013).

Os três genomas completos de *C. striatum* depositados no NCBI (Genbank nº CP021252; CP024931 e CP024932) apresentam 4 cópias do gene 16S rRNA. Recuperamos duas cópias do gene 16S rRNA no genoma da estirpe 2425 usando o banco de dados *RNAmmmer*. Na posição 1379, a mesma apresenta a base guanina (G) nas duas cópias do gene 16S rRNA (**Figura 25**). Esta estirpe apresenta subpopulações resistentes à gentamicina a partir de 48h de incubação. A leitura foi realizada com 24h conforme determinação do documento do CLSI M45-A2 (2010) e o perfil de susceptibilidade foi determinado como sensível, com CIM = 0,12 mg/L (**Tabela 21**). Como a espécie *C. striatum* e demais espécies de corinebactérias possuem 4 cópias do gene 16S rRNA, acreditamos que as demais cópias não recuperadas na montagem do nosso genoma possam ter alguma mutação nesta posição.

As demais estirpes sensíveis à gentamicina e à amicacina (1954, 1961, 2130) e a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 não apresentaram mutações na posição 1379 do operon ribossomal 16S (**Figura 25**), entretanto, a estirpe 2130 carrega o gene *aph(3')-Ia*. Estudos futuros de mapeamento das *reads* para recuperar todas as sequências do gene 16S rRNA serão realizados para comprovar esta hipótese das mutações no operon ribossomal e a presença dos genes relacionados à resistência aos aminoglicosídeos.

Figura 25 - Alinhamento dos genes 16S rRNA recuperados no servidor RNAmmer dos genomas de *C. striatum* e da cepa tipo da espécie (Genbank nº X84442). Em destaque as cepas sensíveis à gentamicina e à amicacina, com adenina (A) na posição 1379, correspondendo à posição 1406 do gene 16S rRNA de *M. tuberculosis*. A estirpe 2425 apresenta a base G na posição 1379, mesmo apresentando fenótipo sensível aos aminoglicosídeos testados.

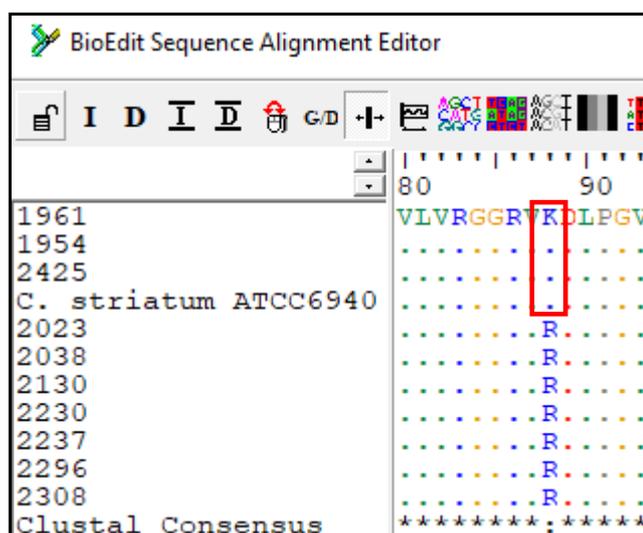


Fonte: (Da autora, 2018).

A resistência aos aminoglicosídeos em *M. tuberculosis* também pode estar relacionada às mutações nos códons 43 e 88 da proteína ribossomal S12 (124 aminoácidos), codificada pelo gene *rpsL*. Buscamos por essas mutações e encontramos uma substituição do aminoácido arginina (R) para lisina (K) no códon 88 das estirpes resistentes (**Figura 26**), porém, a estirpe 2130, sensível à gentamicina e à amicacina tem a mesma sequência de aminoácidos (100% de

similaridade) das estirpes resistentes. Não encontramos mutações na posição 43 da proteína ribossomal S12.

Figura 26 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ribossomal S12 (124 aminoácidos) das estirpes deste estudo e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940. Em destaque, as estirpes sensíveis à gentamicina e à amicacina. No alinhamento é possível observar que a estirpe 2130, também sensível aos aminoglicosídeos testados, sofreu a mesma mutação que as estirpes resistentes, tem o aminoácido arginina (R) na posição 88, enquanto as sensíveis (destacadas) tem o aminoácido lisina (K) nesta posição.



Fonte: (Da autora, 2018).

Em duas estirpes (2130 e 2425) sensíveis aos antimicrobianos gentamicina e amicacina, não foram observadas mutações na sequência de proteínas do gene *aph(3')-Ia*. O contexto genômico deste gene não apresenta discordâncias quando comparado com as estirpes resistentes. Exceto nas estirpes 2023 e 2130, nas demais estirpes, o gene *aph(3')-Ia* estava associado a uma integrase incompleta. O alinhamento da sequência deste fragmento de integrase apresentou 100% de identidade em todas as estirpes. As mutações na proteína ribossomal S12 também não puderam ser correlacionadas com os fenótipos resistentes, uma vez que a estirpe 2130 apresenta a mesma mutação que as resistentes. Quanto às mutações na posição 1379 do operon ribossomal 16S, serão necessários estudos de mapeamento de *reads* para recuperar todas as cópias deste gene e investigar essa correlação com a presença do gene *aph(3')-Ia*.

O gene *aac(3)-XI*, codificante da enzima N-3 acetiltransferase, recentemente descrito em *C. striatum* (GALIMAND et al, 2015) foi encontrado em 44 de 64 estirpes de *C. striatum* em estudo realizado na Espanha (NAVAS et al, 2016). Em nossos estudos, uma proteína anotada como N-acetiltransferase foi encontrada na maioria das estirpes, exceto 1954, 1961 e

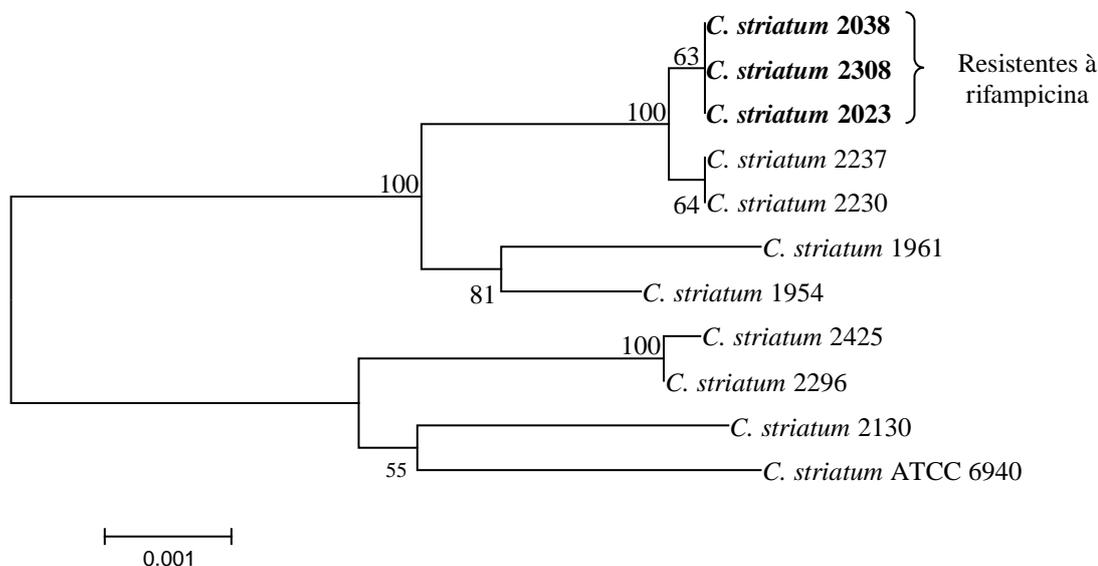
2425. A sequência de aminoácidos de nossas estirpes alinhou um fragmento (71/136 aminoácidos) com a sequência de proteínas do gene *aac(3)-XI* (Genbank nº CTEG01000046) de *C. striatum*, com 52% de identidade, sugerindo que esta pode ser uma enzima N-acetiltransferase ainda não descrita. O gene codificante dessa provável nova enzima está localizado próximo à região de resistência da tetraciclina nas estirpes 2023, 2296 e 2308. Nas demais, encontra-se em regiões distantes dos genes de resistência aqui estudados e em regiões distintas dos genomas.

Em todas as estirpes, os genes relacionados à resistência aos aminoglicosídeos estão associados à presença de elementos genéticos móveis e a elevada similaridade de alguns destes com outras espécies, como *S. enterica*, *P. putida*, *A. radioresistens* entre outras, indicando que estes genes podem ter sido adquiridos por transferência lateral. Os aminoglicosídeos são a segunda linha de tratamento de infecções por corinebactérias e são considerados antibióticos complementares ao tratamento de infecções por *C. striatum* multirresistente (NAVAS et al, 2016).

4.7.7 Resistência à rifampicina

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos do gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, foram analisadas. A árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do gene *rpoB* (**Figura 27**) das estirpes de *C. striatum* e da cepa tipo ATCC 6940 mostrou que as estirpes resistentes à rifampicina (2023, 2038 e 2308) agruparam-se em um clado distinto das estirpes sensíveis à rifampicina e da cepa tipo ATCC 6940, também sensível à rifampicina.

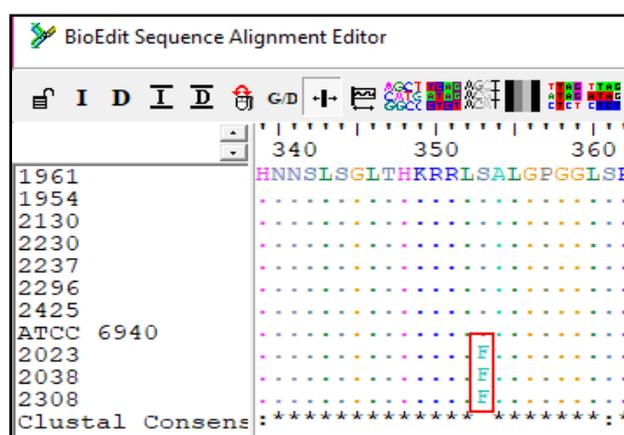
Figura 27 - Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do gene *rpoB* (3.494 posições) das estirpes de *C. striatum* deste estudo e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940, utilizando o método de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 parâmetros). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,001% de divergência. As estirpes resistentes à rifampicina (2023, 2038 e 2308) agruparam-se em um clado distinto das demais estirpes.



Fonte: (Da autora, 2018).

As sequências do gene *rpoB* foram traduzidas em aminoácidos e alinhadas (**Figura 28**). Observamos o alinhamento da sequência completa de aminoácidos e vimos que na posição 353, as estirpes resistentes apresentaram o aminoácido fenilalanina (F) e as estirpes sensíveis possuíam o aminoácido serina (S).

Figura 28 - Alinhamento da sequência de aminoácidos do gene *rpoB* (1073 aminoácidos) das estirpes de *C. striatum* e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940. Em destaque as mutações (serina-S para fenilalanina-F) nas estirpes resistentes à rifampicina na posição 353.



Fonte: (Da autora, 2018).

Acrescentamos às nossas análises, as sequências do gene *rpoB* das cepas tipo de outras espécies de corinebactérias disponíveis no Genbank/NCBI e também da estirpe brasileira de *C. diphtheriae* BH8, isolada da laringe de um paciente com carcinoma no Rio de Janeiro, RJ, Brasil (TROST et al, 2012). Todas depositadas na Coleção de Bactérias do LDCIC/UERJ e CBAS/Fiocruz. As cepas tipo e a estirpe *C. diphtheriae* BH8 foram então cultivadas em meio CAB suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro a 37°C por 24/48h e submetidas à pesquisa da CIM da rifampicina por difusão em gradiente de concentração, conforme protocolo descrito anteriormente. Os resultados da CIM e a interpretação dos fenótipos são apresentados na **Tabela 24**. A estirpe brasileira de *C. diphtheriae* BH8 e as cepas tipo foram sensíveis à rifampicina, exceto a cepa tipo de *C. urealyticum*, que apresentou CIM = 2 mg/L, cujo resultado pode ser interpretado como fenótipo intermediário, como definido pelo documento do CLSI M45-A2 (2010) ou como fenótipo resistente, conforme o documento do BrCAST (2017).

Tabela 24 - Resultados da CIM de rifampicina (mg/L) por difusão em gradiente de concentração adicionadas às análises do *rpoB*

Cepas tipo e estirpe	CIM (mg/L)	BrCAST (2017)			CLSI M45A-2 (2010)		
		S ≤ 0,06	I 0,12-0,5	R > 0,5	S ≤ 1	I 2	R ≥ 4
<i>C. amycolatum</i> ATCC 49368 (T)	<0,002	S			S		
<i>C. afermentans</i> ATCC 51403 (T)	0,016	S			S		
<i>C. jeikeium</i> ATCC 43734 (T)	0,004	S			S		
<i>C. minutissimum</i> ATCC 23348 (T)	0,002	S			S		
<i>C. propinquum</i> ATCC 51488 (T)	0,002	S			S		
<i>C. pseudotuberculosis</i> ATCC 19410 (T)	<0,002	S			S		
<i>C. striatum</i> ATCC 6940 (T)	0,002	S			S		
<i>C. urealyticum</i> ATCC 43042 (T)	2	R			I		
<i>C. xerosis</i> ATCC 373 (T)	0,004	S			S		
<i>C. diphtheriae</i> BH8	<0,002	S			S		

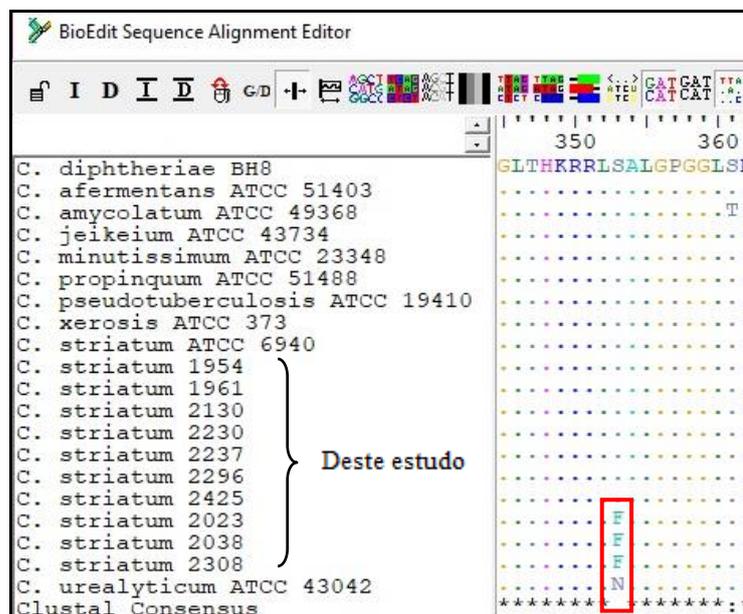
(T) cepa tipo; S, sensível; I, intermediário; R, resistente. Em destaque (negrito) os fenótipos intermediário ou resistente para a cepa tipo *C. urealyticum* ATCC 43042.

Fonte: (Da autora, 2018).

Com os resultados dos fenótipos de susceptibilidade à rifampicina, recuperamos as sequências de proteínas das cepas tipo e outras estirpes disponíveis no Genbank, listadas na **Tabela 24**. O alinhamento destas sequências é apresentado na **Figura 29**. Todas as estirpes sensíveis à rifampicina possuem na posição 353 o aminoácido serina (S). As estirpes resistentes de *C. striatum* (2023, 2038 e 2308) possuem o aminoácido fenilalanina (F). A cepa

tipo de *C. urealyticum* ATCC 43042 que apresentou fenótipo intermediário ou resistente à rifampicina possui o aminoácido asparagina (N).

Figura 29 - Alinhamento da sequência completa de aminoácidos do gene *rpoB* das estirpes de *C. striatum*, *C. diphtheriae* BH8 e outras cepas tipo de corinebactérias. Em destaque as estirpes de *C. striatum* resistentes à rifampicina (2023, 2038 e 2308), cujas mutações resultaram na substituição da serina (S) para fenilalanina (F) na posição 353 e a cepa tipo de *C. urealyticum* ATCC 43042, mostrando a mudança de serina (S) para asparagina (N).



Fonte: (Da autora, 2018).

Ampliamos os nossos estudos do gene *rpoB* desenhando um par de iniciadores (**Tabela 25**) que abrange a região envolvida na possível resistência à rifampicina (posição 353 da sequência de aminoácidos). Estirpes de *C. striatum* (N=8), *C. amycolatum* (N=3), *C. urealyticum* (N=2) e *C. jeikeium* (N=2), isoladas de sítios intravenosos e resistentes à rifampicina, cujos fenótipos foram confirmados pelo método de disco-difusão (RAMOS, 2014), foram acrescentadas às nossas análises. Todas as estirpes adicionadas foram anteriormente identificadas pelas análises das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*. A região do gene *rpoB* possivelmente envolvida na resistência à rifampicina foi então amplificada e sequenciada. Estas estirpes foram submetidas ao teste de suscetibilidade à rifampicina por difusão em gradiente de concentração para determinação da CIM.

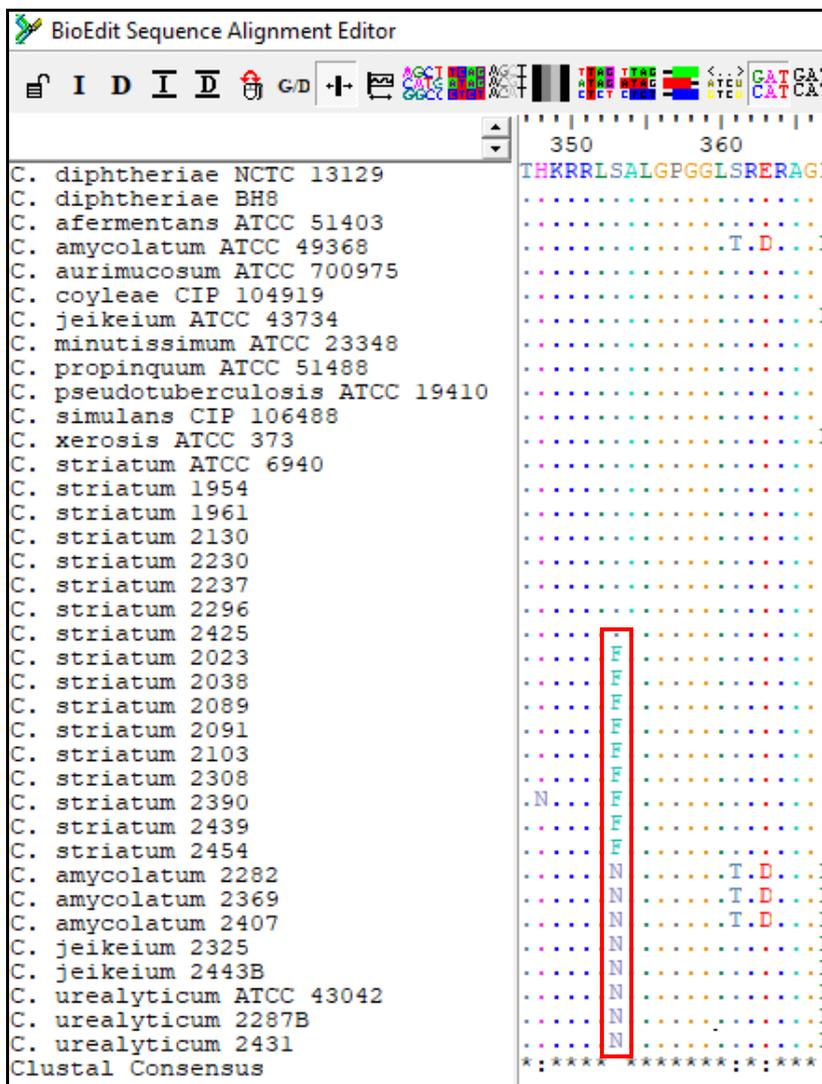
Tabela 25 - Sequências dos iniciadores desenhados para a amplificação e sequenciamento da região de resistência à rifampicina do gene *rpoB*

Iniciador	Sequência do iniciador 5'-3'	Fragmento (pb)	Função
<i>rpoB</i> F	TCBCGYATGGAGCGCGT	~ 875	Resistência à rifampicina
<i>rpoB</i> F <i>C. amycolatum</i>	GTGAGCGCATGACCACTC		
<i>rpoB</i> R	CGGTTVGCRTCCTCGTGCTC		

O iniciador *rpoB* F *C. amycolatum* foi desenhado para amplificar o gene *rpoB* da espécie *C. amycolatum*.
Fonte: (Da autora, 2018).

Após a amplificação e sequenciamento da região de interesse do gene *rpoB* de 15 estirpes de corinebactérias, as sequências foram traduzidas em aminoácidos e a análise filogenética foi realizada. As sequências do gene *rpoB* das cepas tipo foram recuperadas no Genbank/NCBI. O alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *rpoB* de todas as estirpes e cepas tipo utilizadas na análise filogenética é mostrado na **Figura 30**. Todas as estirpes de corinebactérias sensíveis à rifampicina, incluindo as cepas tipo, possuem uma serina (S) na posição 353. Todas as estirpes de *C. striatum* resistentes à rifampicina apresentaram mutação nessa posição e houve uma mudança de serina para fenilalanina (S → F). Todas as estirpes de *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. urealyticum* e a cepa tipo de *C. urealyticum* apresentaram mutação de serina para asparagina (S → N).

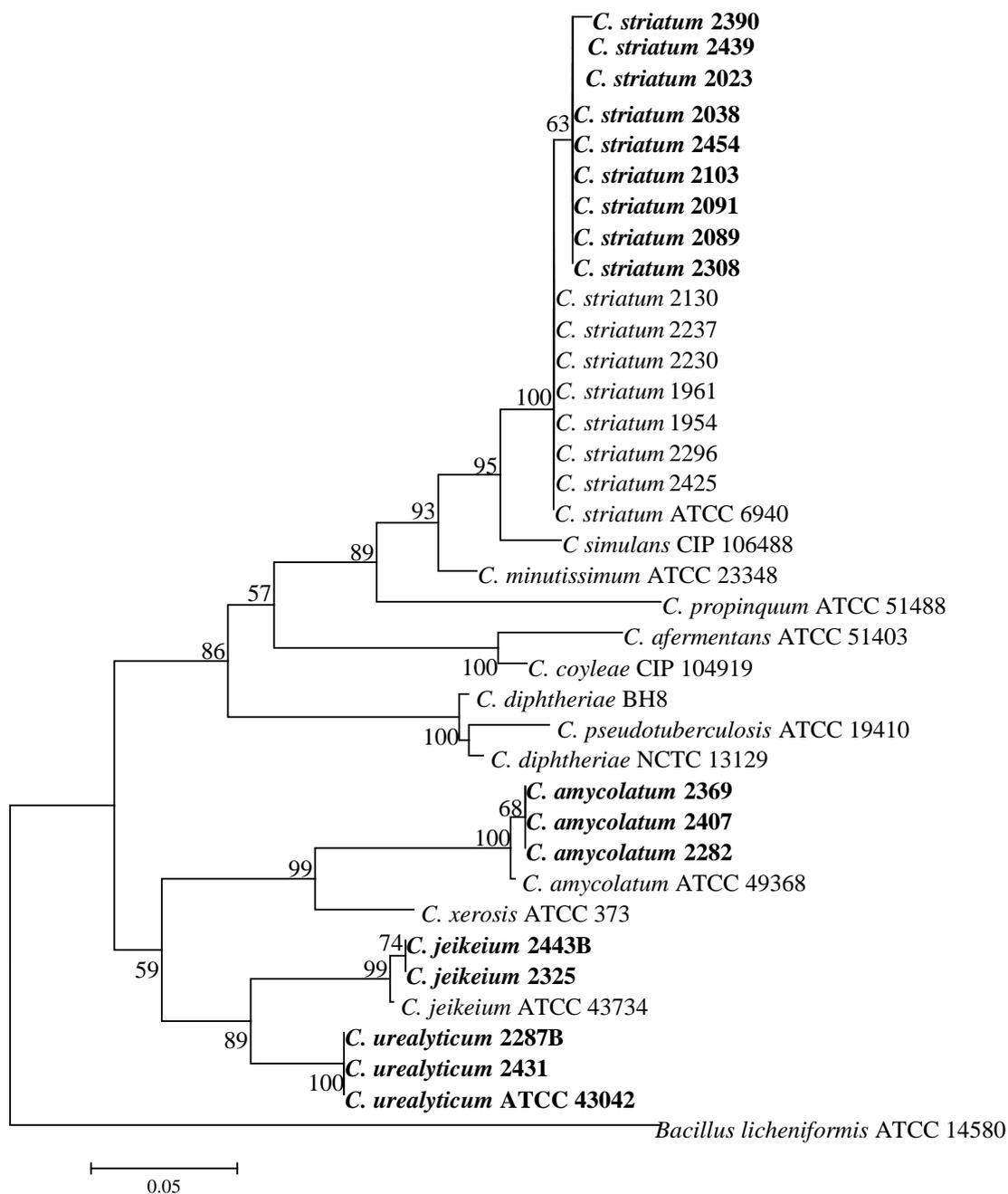
Figura 30 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da região de resistência à rifampicina do gene *rpoB* das estirpes de *C. striatum* deste estudo e das estirpes de *C. amycolatum* (2282, 2369 e 2407), *C. aurimucosum* (ATCC 700975), *C. diphtheriae* (BH8), *C. jeikeium* (2325 e 2443B), *C. striatum* (2089, 2091, 2103, 2390, 2439 e 2454), *C. urealyticum* (2287B e 2431) e das cepas tipo de *C. diphtheriae* (NCTC 13129), *C. afermentans* (ATCC 51403), *C. amycolatum* (ATCC 49368), *C. coyleae* (CIP 104919), *C. minutissimum* (ATCC 23348), *C. propinquum* (ATCC 51488), *C. pseudotuberculosis* (ATCC 19410), *C. simulans* (CIP 106488), *C. striatum* (ATCC 6940), *C. xerosis* (ATCC 373) e *C. urealyticum* (ATCC 43042). Em destaque as estirpes com fenótipos intermediários ou resistentes. S, serina; F, fenilalanina; N, asparagina.



Fonte: (Da autora, 2018).

Nota-se que nas análises filogenéticas do gene *rpoB* (**Figura 31**), as estirpes de *C. striatum* sensíveis à rifampicina agrupam-se junto com a também sensível cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940. As estirpes de *C. amycolatum* (2282, 2407 e 2369) resistentes à rifampicina agrupam-se separadamente da cepa tipo de *C. amycolatum* CIP 103452. O mesmo acontece com as espécies de *C. jeikeium* (2325 e 2443B) e *C. urealyticum* (2287B e 2431).

Figura 31 - Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene *rpoB* (157 posições) utilizando o método de *Neighbor-Joining* (método de correção Poisson). Valores de *Bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0,05% de divergência. Em destaque (negrito) as estirpes de *C. striatum* (2390, 2439, 2023, 2038, 2454, 2103, 2091, 2089, 2308), *C. amycolatum* (2369, 2407 e 2282), *C. jeikeium* (2443B e 2325) e *C. urealyticum* (2287B e 2431) resistentes à rifampicina, bem como a cepa tipo de *C. urealyticum* ATCC 43042 (fenótipo intermediário ou resistente). Os fenótipos sensíveis da cepa tipo *C. simulans* CIP 106488, *C. diphtheriae* NCTC 13129, *C. coyleae* CIP 104919 e também da estirpe clínica *C. aurimucosum* ATCC 700975 foram obtidos na literatura. Números de acesso das sequências de aminoácido do gene *rpoB* obtidas no Genbank/NCBI: *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (AAU21754); *C. afermentans* ATCC 51403 (AAS89227); *C. amycolatum* ATCC 49368 (AAS89203); *C. aurimucosum* ATCC 700975 (ACP31967); *C. coyleae* CIP 104919 (AAS89212); *C. diphtheriae* BH8 (AEX47907); *C. diphtheriae* NCTC 13129 (CAE48951); *C. jeikeium* ATCC 43734 (EEW15876); *C. minutissimum* ATCC 23348 (WP_039673593); *C. propinquum* ATCC 51488 (AAS89241); *C. simulans* CIP 106488 (AAS89226); *C. striatum* ATCC 6940 (EEI78277), *C. urealyticum* ATCC 43042 (CAQ04260) e *C. xerosis* ATCC 373 (KKO81651).



Fonte: (Da autora, 2018).

A relação entre as mutações encontradas na posição 353 da região do gene *rpoB* possivelmente envolvida na resistência à rifampicina com as CIMs está mostrada na **Tabela 26**. As estirpes de *C. amycolatum*, *C. jeikeium* e *C. urealyticum* que apresentaram mudança de serina para asparagina (S → N) na posição 353, mesma mutação observada na cepa tipo *C. urealyticum* ATCC 43042, apresentaram CIM variadas (2 a 8 mg/L).

Tabela 26 - Relação entre as mutações na região do gene *rpoB* possivelmente envolvida na resistência à rifampicina e as CIM para rifampicina das estirpes e cepas tipo de corinebactérias.

Espécies	Estirpes	rpoB (aminoácidos) Posição 353	CIM (mg/L) Rifampicina	BrCAST (2017)			CLSI M45- A2 (2010)		
				S ≤ 0.06	I 0.12- 0.5	R > 0.5	S ≤ 1	I 2	R ≥ 4
<i>C. striatum</i>	1954	S (serina)	<0,002	S	S	S	S	S	
	1961		<0,002						
	2130		0,003						
	2230		0,002						
	2237		0,002						
	2296		<0,002						
	2425		<0,002						
	ATCC 6940		0,002						
	2023	F (fenilalanina)	>32	R	R	R	R	R	
	2038		>32						
	2089		>32						
	2091		>32						
	2103		>32						
	2308		>32						
	2390		>32						
	2439		>32						
2454	>32								
<i>C. amycolatum</i>	2282	N (asparagina)	6-8	R	R	R	R	R	
	2369		3					I	
	2407		2					I	
	ATCC 49368	S) (serina)	<0,002	S	S				
<i>C. urealyticum</i>	2287B	N (asparagina)	3-4	R	R	R	R	I	
	2431		3					I	
	ATCC 43042		2					I	
<i>C. jeikeium</i>	2325	N (asparagina)	>32	R	R	R	R	R	
	2443B		>32					R	
	ATCC 43734	S (serina)	0,004	S	S				
<i>C. minutissimum</i>	ATCC 432348	S (serina)	0,002	S	S				
<i>C. diphtheriae</i>	BH8	S (serina)	<0,002	S	S				

Leitura dos halos realizada com 24h, conforme determinação dos documentos de referência (CLSI e BrCAST). Com 48h de incubação, as estirpes de *C. amycolatum*, *C. jeikeium* e *C. urealyticum* apresentaram CIM >32 mg/L.

Fonte: (Da autora, 2018).

Nenhum outro gene envolvido na resistência à rifampicina, como genes codificantes de enzimas inativantes da rifampicina foi encontrado.

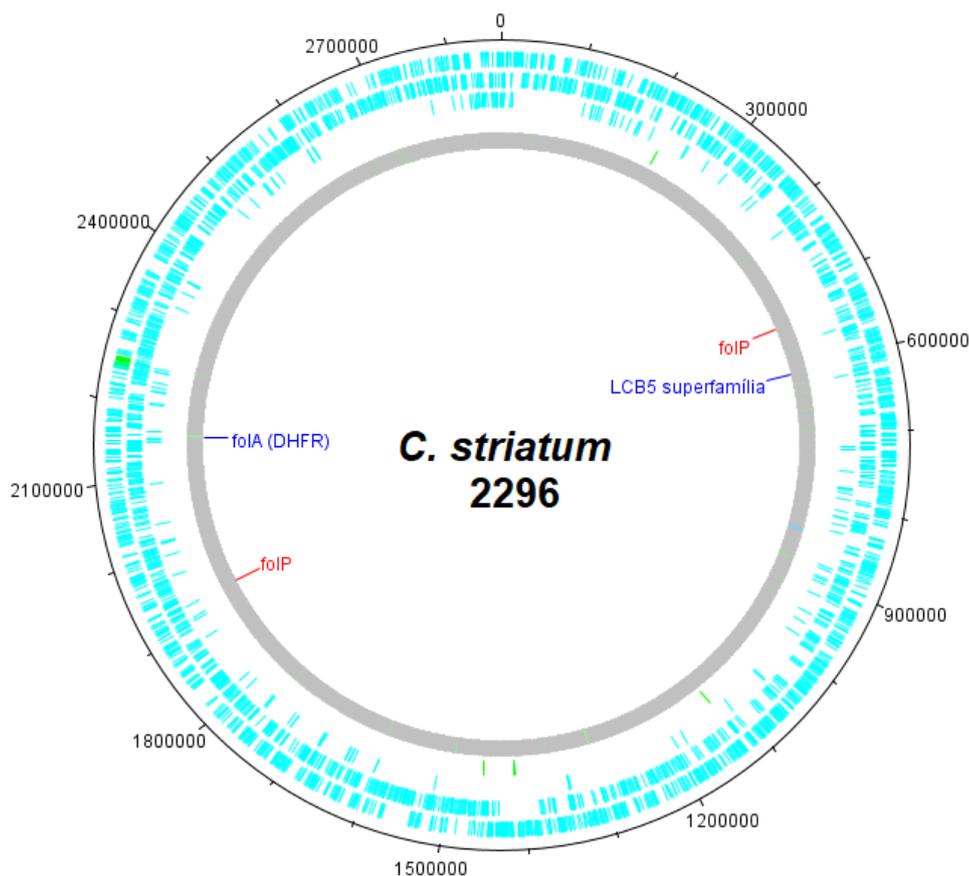
Atualmente, a rifampicina é um dos medicamentos utilizados no tratamento de tuberculose no Brasil, cuja taxa de incidência é de 44 casos/100.000 pessoas. Na cidade do Rio de Janeiro essa taxa aumenta para 54,5 casos/100.000 pessoas, uma das maiores do Brasil. A taxa de resistência à rifampicina em *M. tuberculosis*, entre 1997 e 2007, aumentou de 0,2% para 1,5%. O uso deste medicamento induz a seleção de bacilos mutantes resistentes à droga (SILVA; MELLO; FIGUEIREDO, 2017). Provavelmente, essa pressão seletiva acomete os micro-organismos da microbiota de pele e de mucosas, como as corinebactérias, apesar deste medicamento não ser comumente utilizado no tratamento de infecções por corinebactérias.

4.7.8 Resistência à sulfonamida associada ao trimetoprim

Não há estudos sobre os mecanismos de resistência ao cotrimoxazol em corinebactérias. Nossas pesquisas foram baseadas em estudos sobre mutações cromossomais nos genes envolvidos na via do ácido fólico e genes adquiridos por transferência lateral.

Os genes cromossomais *folP* e *folA* das estirpes deste estudo e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 foram recuperados. Duas cópias do gene *folP* foram encontrados em todas as estirpes, codificando proteínas com domínios de DHPS. Em cada estirpe, as cópias não são idênticas, apresentam em média 35% de identidade nas proteínas (92/265 aminoácidos) e encontram-se em regiões distintas dos cromossomos. Quanto ao gene *folA*, anotado como codificante do produto diacilglicerol quinase pelo NCBI, encontramos apenas uma cópia codificante da enzima DHFR. Outro gene anotado como codificante do produto diacilglicerol quinase pelo NCBI possui domínio quinase lipídico da família diacilglicerol quinase, pertencente à superfamília LCB5, e não possui ação relacionada à via do folato (**Figura 32**). As sequências de aminoácidos desses dois genes anotados como codificantes do mesmo produto (diacilglicerol quinase) foram alinhadas e apresentaram 33% de identidade (18/55 aminoácidos).

Figura 32 – Localizações dos genes *folP* e *folA* no cromossomo da estirpe 2296 (representando as demais estirpes). Figura gerada pelo programa *DNAPlotter* (CARVER et al, 2009).



Fonte: (Da autora, 2018).

Todas as estirpes e a cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940 foram submetidas à pesquisa da CIM do sulfametoxazol-trimetoprim (1/19) por difusão em gradiente de concentração. Apenas o documento do CLSI M45-A2 (2010) traz pontos de corte para este antimicrobiano. Segundo os critérios deste documento, apenas quatro estirpes foram resistentes (2038, 2230, 2237 e 2296). Mutações no gene *folP* não foram encontradas e normalmente estão associadas à resistência às sulfonamidas em bactérias Gram-positivas (BUWEMBO et al, 2013, FIEBELKORN; CRAWFORD; JORGENSEN, 2005, GIBREEL; SKOLD, 1999, VALDERAS et al, 2008, WU et al, 2010). Foram encontradas nas estirpes com fenótipos de resistência ao cotrimoxazol mutações na posição 96 (isoleucina para leucina) da sequência de aminoácidos do gene *folA*. A relação entre a CIM do sulfametoxazol-trimetoprim e as mutações encontradas no gene *folA* está mostrada na **Tabela 27**.

Tabela 27 - Relação entre a CIM do sulfametoxazol associado ao trimetoprim (1/19) e as mutações encontradas no gene *folA* das estirpes de *C. striatum* desse estudo e da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940.

Estirpes	Gene <i>sull</i>	Gene <i>folA</i> (aminoácidos) Posição 96	CIM (mg/L) Sulfametoxazol-Trimetoprim	CLSI M45-A2 (2010)	
				S ≤ 2/38	R ≥ 4/76
1954	-	I	0,75	S	
1961	-		0,19		
2023	-		1,0		
2130	+		0,75		
2308	-		1,5		
2425	+		2		
ATCC 6940	-		0,25		
2038	-	L	8	R	
2230	-		6		
2237	-		4		
2296	+		>32		

-, ausência; +, presença; I, isoleucina; L, leucina; S, sensível; R, resistente
 Fonte: (Da autora, 2018).

As estirpes resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim (2038, 2230, 2237 e 2296) apresentaram CIM maiores que 4 mg/L. Além da mutação na posição 96 da sequência de aminoácidos do gene *folA*, a estirpe 2296 carrega o gene *sull*, que confere resistência às sulfonamidas e geralmente está associado aos integrons. Essa estirpe apresentou a maior CIM encontrada (>32 mg/L). O gene *sull*, único gene associado à resistência às sulfonamidas encontrado pela pesquisa realizada nos bancos de dados de genes de resistência, foi encontrado nas estirpes 2130, 2296 e duas cópias na estirpe 2425. Estas mesmas estirpes amplificaram o gene da integrase I pela reação de PCR realizada anteriormente ao sequenciamento dos genomas. A integrase I é codificada pelo gene que faz parte dos integrons de classe 1, frequentemente observado em amostras clínicas (FLUIT; SCHMITZ, 1999, 2004; STOKES; HALL, 1989) e o gene *sull* geralmente está associado aos integrons de classe I. As demais estirpes *sull*-positivas (2130 e 2425) foram susceptíveis ao sulfametoxazol-trimetoprim. No entanto, a presença apenas deste gene não é um critério para avaliar o perfil

de susceptibilidade a estes antimicrobianos, uma vez que não foi possível determinar a CIM da sulfonamida isolada, apenas desta associada ao trimetoprim.

A busca por genes *dfr*, adquiridos por transferência lateral, codificantes da DHFR, normalmente associados aos integrons, que conferem resistência ao trimetoprim foi realizada utilizando os algoritmos *Blastn* e *Blastx* no *Bioedit* com limite mínimo de busca de 30%. Nenhum gene foi localizado em nossos genomas e no genoma da cepa tipo de *C. striatum* ATCC 6940.

A duplicação gênica do gene *folP* foi observada nas estirpes de *C. striatum* deste estudo, mas nenhuma mutação encontrada pôde ser associada com os fenótipos resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim. Quatro estirpes com fenótipos de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim apresentaram mutações na sequência de aminoácidos do gene *folA*. Estas mutações podem ter ocorrido de forma espontânea ou induzida pelo uso da droga, uma vez que o cotrimoxazol é usado para uma variedade de infecções clínicas, incluindo infecções do trato respiratório e infecções de pele, como nocardiose cutânea (MICHALEK et al, 2015).

4.7.9 Pesquisa do mobiloma

4.7.9.1 Integrons

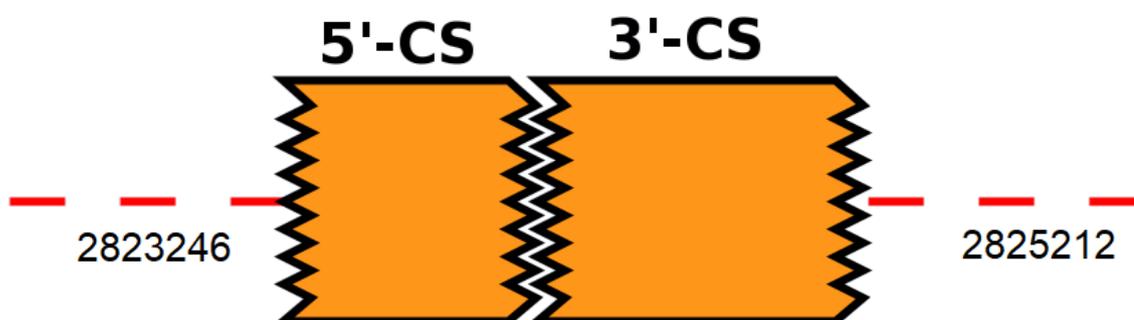
Diversos são os estudos sobre o papel dos integrons na multirresistência em bactérias Gram-negativas. No entanto, são escassos os estudos sobre a presença de integrons em bactérias Gram-positivas, especialmente em corinebactérias. Até o momento, apenas integrons de classe I têm sido descritos em corinebactérias, como *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. resistens* e *Corynebacterium casei*, esta última espécie carregando múltiplos cassetes de genes de resistência (BARRAUD et al, 2011, LI et al, 2017, NANDI et al, 2004, SCHRODER et al, 2012).

Em nossos estudos, encontramos o integron de classe I em 3 estirpes multirresistentes (2130, 2296 e 2425). Antes do sequenciamento genômico, realizamos a pesquisa do gene da integrase I pela técnica de PCR nas 21 estirpes de *C. striatum* (**Tabela 5**). O gene da integrase foi amplificado apenas nessas três estirpes, descartando a possibilidade de contaminação durante o sequenciamento de alta vazão.

Após o sequenciamento dos genomas das dez estirpes, notamos que as três estirpes integrase-positivas descritas acima foram as mesmas em que o gene *sulI* foi encontrado após a submissão dos genomas nos bancos de dados de genes de resistência (**Tabela 12**).

Submetemos os genomas aos bancos de dados INTEGRALL e RAC para a busca e anotação dos integrons. Nas três estirpes os integrons não possuem cassetes de genes de resistência, apenas os segmentos conservados 3'-CS e 5'CS, como demonstrado na **Figura 33**. O segmento 3'-CS é constituído pelos genes $\Delta qacE$, associado à tolerância aos quaternários de amônio; gene *sulI* e ORF5. No segmento 5'CS está incluído o gene da integrase e o promotor do integron.

Figura 33 - Imagem gerada pelo banco de dados RAC da estirpe 2425, representando as outras 2 estirpes que também possuem integrons vazios. O O segmento 3'-CS é constituído pelos genes $\Delta qacE$, associado à tolerância aos quaternários de amônio; gene *sulI* e ORF5. No segmento 5'CS inclui o gene da integrase e o promotor do integron.



Fonte: (Da autora, 2018).

O gene *intI*, codificante da integrase I, foi recuperado nos genomas, com 1014 pb e 100% de identidade com as sequências de *V. cholerae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *S. enterica*, *E. coli*, entre outras espécies depositadas no Genbank. Já as sequências do *sulI*, com 852 pb, apresentaram 100% de identidade com as sequências de *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *S. enterica*, *E. coli* entre outras espécies, depositadas no Genbank. A elevada similaridade com as sequências de outras espécies indica que esses genes provavelmente foram adquiridos por transferência lateral. No entanto, nenhum cassete gênico de resistência foi encontrado nos integrons e estes não puderam ser relacionados com a multirresistência em nossas estirpes.

4.7.9.2 Sequências de inserção

Todos os genomas foram submetidos ao banco de dados *ISFinder* e as SI foram encontradas em todos os genomas, listadas no **Quadro 1**.

As SI podem ocorrer em uma variedade de números de cópias em um genoma (VANDERCRAEN et al, 2017). Mais de 4.500 SI foram identificadas até o momento, classificadas em 29 famílias. O número de cópias de SI em alguns de nossos genomas é altamente elevado, chegando a 700 SI em alguns (dados não mostrados). As SI podem mover dentro do genoma ou entre genomas horizontalmente, como parte de outros elementos genéticos móveis, como plasmídeos e fagos. As SI podem causar deleções, inversões, duplicações de genes e podem estar associadas aos genes de resistência (SIGUIER et al, 2006, VANDERCRAEN et al, 2017). Em nossos estudos, focamos nas SI associadas aos genes de resistência.

Reportamos no **Quadro 1**, apenas as SI que apresentaram alinhamentos significantes, com E-value igual a zero. A busca pelos aminoácidos das SI foi feita usando o algoritmo *Blastx* e parâmetros padrão do banco de dados. A maioria das SI reportadas estavam associadas aos genes de resistência relatados anteriormente e foram descritas originalmente em plasmídeos ou transposons de corinebactérias.

A *IS1513*, encontrada em todas as estirpes, é descrita na literatura como parte do transposon *Tn5564* em corinebactérias, adjacente ao gene *cmx*, que confere resistência ao cloranfenicol (TAUCH et al, 1998). Mas na maioria das estirpes, a *IS1513* não estava associada ao *Tn5564*.

Quadro 1 - Sequências de inserção encontradas pelo alinhamento local de proteínas utilizando o programa *ISfinder* nas estirpes de *C. striatum* deste estudo.

SI/Família	Origem	1954	1961	2023	2038	2130	2230	2237	2296	2308	2425
1513/30	Plasmídeo de <i>C. striatum</i> (AF024666)										
1249/256	Transposon de <i>C. striatum</i> (U21300)	2				2					
5564/481	Plasmídeo de <i>C. striatum</i> (AF024666)			2	3	2	3	4	2	4	2
3501/3	Plasmídeo de <i>C. jeikeium</i> (AY036070)	2			2				2	2	
3506/256	<i>C. jeikeium</i> (AY266269)										
3507/256	<i>C. jeikeium</i> (CR931997)										
1132/256	<i>C. diphtheriae</i> (A07012)										
Cur2/256	<i>C. urealyticum</i> DSM7109 (NC_010545)										
1207/L3	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (X96962)						3				
Actu1/256	<i>Actinomyces turicensis</i> (AGWQ01000008.1)				2		2	2	2		
ISAcba1/1595	<i>Actinobacteria bacterium</i> (MKSW01000042)										
Tn5393/Tn3	<i>Erwinia amylovora</i> (M96392)				2	2	2	3	3	2	3
Pulsotipo/PFGE		IV	III	I	II	V	VI	VI	VII	I	IX
Perfil de suscetibilidade		G	G	A	A	D	B	B	C	A	E

A cor amarela indica a presença da SI e os números indicam a quantidade de SI encontradas nos genomas.

Fonte: (Da autora, 2018).

A *IS1249*, pertencente à família 256, apresenta mais de 30 membros presentes em actinobactérias e firmicutes (SIGUIER et al, 2006). Foi descrita pela primeira vez no transposon Tn5432 de *C. striatum* (TAUCH et al, 1995), flanqueando o gene de resistência *ermX* (associado à resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B em corinebactérias). A *IS1249* estava associada ao *ermX*, exceto nas estirpes 2296 e 2425, únicos genomas em que esta SI não foi encontrada. Mas apenas nas estirpes 2023 e 2130, a *IS1249* estava flanqueando o gene *ermX*, formando o Tn5432. Esta SI também faz parte da região de resistência à tetraciclina, adjacente ao gene *tetA*, como descrito por Tauch et al (2005). Exceto na estirpe 2130, a *IS1249* não estava adjacente ao gene *tetA*.

As estirpes 2023 e 2308 não apresentaram o mesmo número de SI, apesar de pertencerem ao pulsotipo I e terem mesmo perfil de resistência (ANEXO A). A *IS3501* não foi encontrada no genoma da estirpe 2023, nem a *IS1132* foi encontrada na estirpe 2308. A mesma observação é válida para as estirpes 2230 e 2237, do mesmo paciente, com intervalo de 1 mês no isolamento, que possuem o mesmo pulsotipo e perfil de resistência. O número e as SI não são homogêneos, mas por não serem genomas completos, as SI de várias cópias podem ser agrupadas em único *contig* e normalmente os *contigs* são quebrados nas localizações das SI. Assim, cada cópia da SI pode não ser colocada em sua localização genômica correta durante a montagem, a menos que sejam utilizadas *reads* de comprimentos longos, provenientes de outras estratégias de sequenciamento (ADAMS; BISHOP; WRIGHT, 2016). Na estratégia utilizada em nossos sequenciamentos, as *reads* possuem tamanho em média de 150 pb.

A *IS5564* não foi encontrada nas estirpes sensíveis 1954 e 1961. Exceto no genoma da estirpe 2425, a *IS5564* não estava associada ao gene *cmx*. Nas estirpes 2023 e 2130, esta SI estava flanqueando o gene *cmx* formando o Tn5564.

O Tn5393 encontrado aqui refere-se à transposase da família Tn3 encontrada em todas as estirpes multirresistentes, associada à região de resistência aos aminoglicosídeos. Esta transposase foi descrita pela primeira vez em *Erwinia amylovora*, uma bactéria Gram-negativa fitopatogênica, responsável pela doença conhecida como fogo bacteriano em macieiras, principalmente na Europa e Estados Unidos (FOLSTER et al, 2015).

Uma variabilidade genética na composição e o elevado número de SI encontrados nas estirpes de *C. striatum* deste estudo (dados não mostrados) demonstram a enorme plasticidade dos genomas bacterianos e adaptabilidade de características fenotípicas, incluindo a resistência a agentes antimicrobianos.

4.7.9.3 Plasmídeos

A pesquisa por plasmídeos no *PlasmidFinder* foi realizada com o menor limite de busca disponível (50%), usando os bancos de dados para *Enterobacteriaceae* e o de bactérias Gram-positivas. Não encontramos nenhum gene associado à replicação de plasmídeos. Buscamos as sequências depositadas neste banco de dados e observamos a ausência de genes associados à replicação de plasmídeos em corinebactérias. Recuperamos 23 sequências nucleotídicas no GenBank de plasmídeos de *Corynebacterium* spp. (**Tabela 28**).

Tabela 28 - Lista dos genes *rep* de plasmídeos de *Corynebacterium* spp. obtidos em 30/10/2016.

Gene	Plasmídeo/Espécie	Nº acesso no Genbank
<i>repA</i>	pB85766 <i>C. jeikeium</i>	AF486522
<i>repA</i>	pK64 <i>C. jeikeium</i>	AY079086
<i>repA</i>	pCJ84 <i>C. jeikeium</i>	AY048596
<i>rep</i>	pGA1 <i>C. glutamicum</i>	X90817
<i>repA</i>	pCRG2 <i>C. glutamicum</i>	AB525231
<i>repA</i>	pBL90 <i>C. glutamicum</i>	KU306397
<i>repA</i>	pK43 <i>C. jeikeium</i>	AF364477
<i>repB11</i>	pB11 <i>C. glutamicum</i>	AF092037
<i>repA</i>	pNG2 <i>C. diphtheriae</i>	AF492560
<i>repA</i>	pTET3 <i>C. glutamicum</i>	NC_003227
<i>rep</i>	pCC1 <i>Corynebacterium callunae</i>	AJ308231
<i>repA</i>	pCR1 <i>Corynebacterium renale</i>	NC_004833
<i>rep</i>	pCdoos1 <i>Corynebacterium doosanense</i>	CP006765
<i>repW</i>	pCha1 <i>Corynebacterium halotolerans</i>	CP003698
<i>repA</i>	pA501 <i>C. jeikeium</i>	AY266269
<i>repW</i>	pET44827 <i>C. aurimucosum</i>	FM164414
<i>repA</i>	pXZ608 <i>C. glutamicum</i>	NC_004941
<i>repW</i>	pCmarinum1 <i>Corynebacterium marinum</i>	CP007792
<i>repW</i>	pJA144188 <i>C. resistens</i>	NC_014167
<i>repI</i>	pCASE1 <i>Corynebacterium casei</i>	NC_011030
<i>repA</i>	pKW4 <i>C. jeikeium</i>	AF401314
<i>repB</i>	pCul210931 <i>Corynebacterium ulcerans</i>	NZ_CP009584
<i>repB</i>	pTP10 <i>C. striatum</i>	AF024666

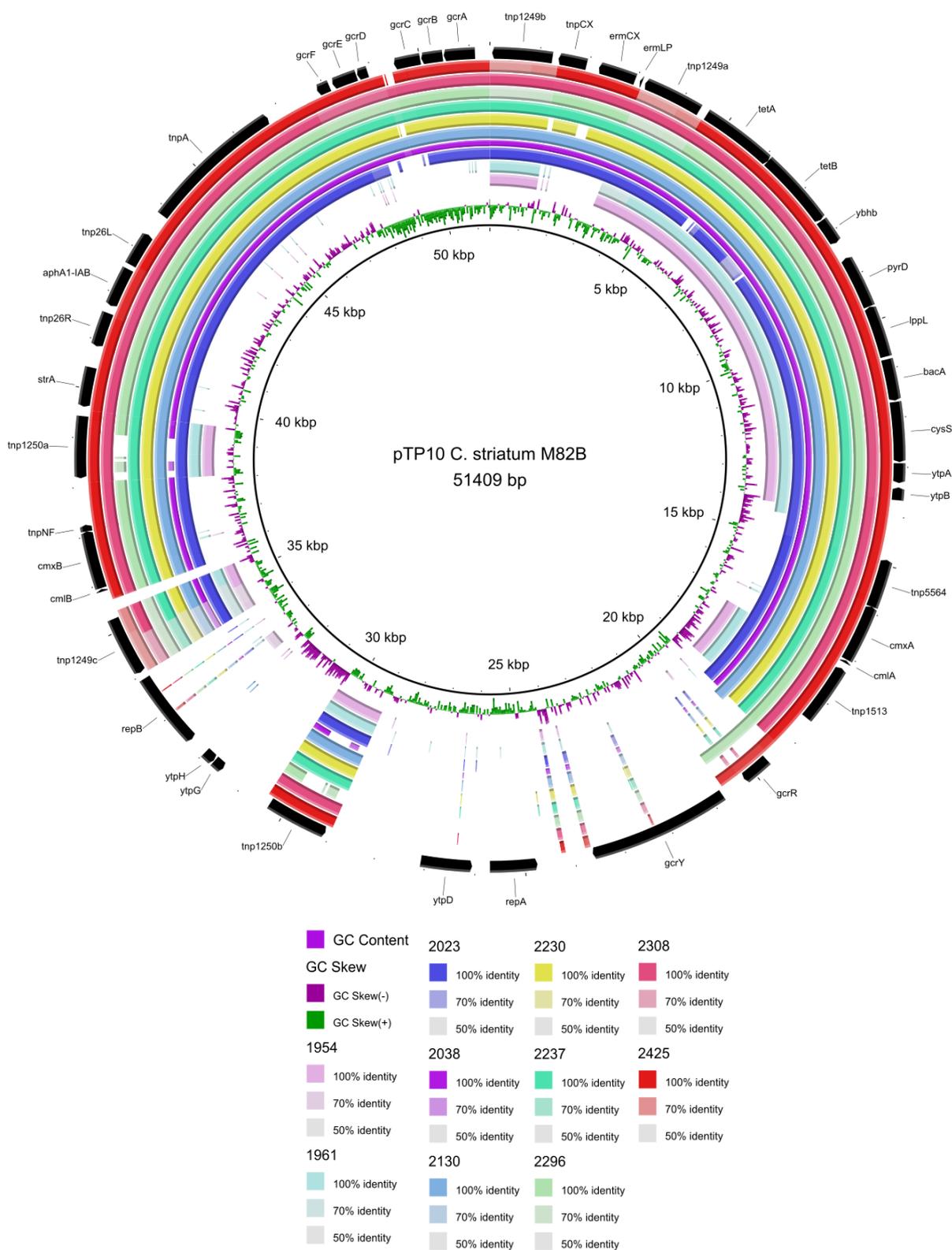
Fonte: (adaptado de GENBANK, 2016).

Refizemos nossas análises, com valor de 30% de limite mínimo para identidade, usando o algoritmo *Blastn* no programa *Bioedit*. Apenas na estirpe 1954, um alinhamento com 86% de identidade num fragmento (474/548 nucleotídeos) com o gene *repA* (tamanho de 1.452 pb) do plasmídeo pNG2 de *C. diphtheriae* foi encontrado. Recuperamos a sequência de aminoácidos do possível gene *repA* no genoma da estirpe 1954 e fizemos um alinhamento local usando o *Blastp*/NCBI desta sequência. Nenhum domínio conservado putativo foi encontrado nesta sequência, razão pela qual foi anotada como proteína hipotética pelo NCBI.

Posteriormente, realizamos experimentos de extração de DNA plasmidial por PFGE sem uso de enzimas de restrição em todas as estirpes, conforme protocolo descrito na literatura (ALDUINA; PISCIOTTA, 2015; RAMÍREZ-BAHENA; NESME; MULLER, 2012). Não evidenciamos nenhum plasmídeo. Anteriormente ao sequenciamento dos genomas, realizamos experimentos de amplificação do gene *repB* encontrado no plasmídeo pTP10 de *C. striatum* por PCR nas 21 estirpes inicialmente estudadas e nenhum amplicon foi evidenciado.

Utilizamos o programa *BLAST Ring Image Generator* (BRIG) (ALIKHAN et al, 2011) para gerar uma imagem comparativa entre os nossos genomas e alguns plasmídeos de corinebactérias multirresistentes. A **Figura 34** traz a comparação dos genomas deste estudo com o plasmídeo pTP10 da estirpe clínica multirresistente *C. striatum M82B* (Genbank nº AF024666), uma vez que este plasmídeo de 51 kb carrega 16 genes relacionados à resistência aos antimicrobianos (TAUCH et al, 1999). Podemos observar que uma grande parte do conteúdo genético do plasmídeo pTP10 está presente nos genomas das estirpes multirresistentes com elevada similaridade, com exceção da maquinaria de replicação (genes *repA* e *repB*), associados a elementos genéticos móveis.

Figura 34 – Comparação dos genomas de *C. striatum* deste estudo com o plasmídeo pTP10 *C. striatum* M82B. Imagem gerada no programa *BRIG* utilizando o algoritmo *Blastn* para comparação entre o plasmídeo e os genomas. O círculo preto externo representa o plasmídeo pTP10 com as suas respectivas anotações.



Fonte: (Da autora, 2018).

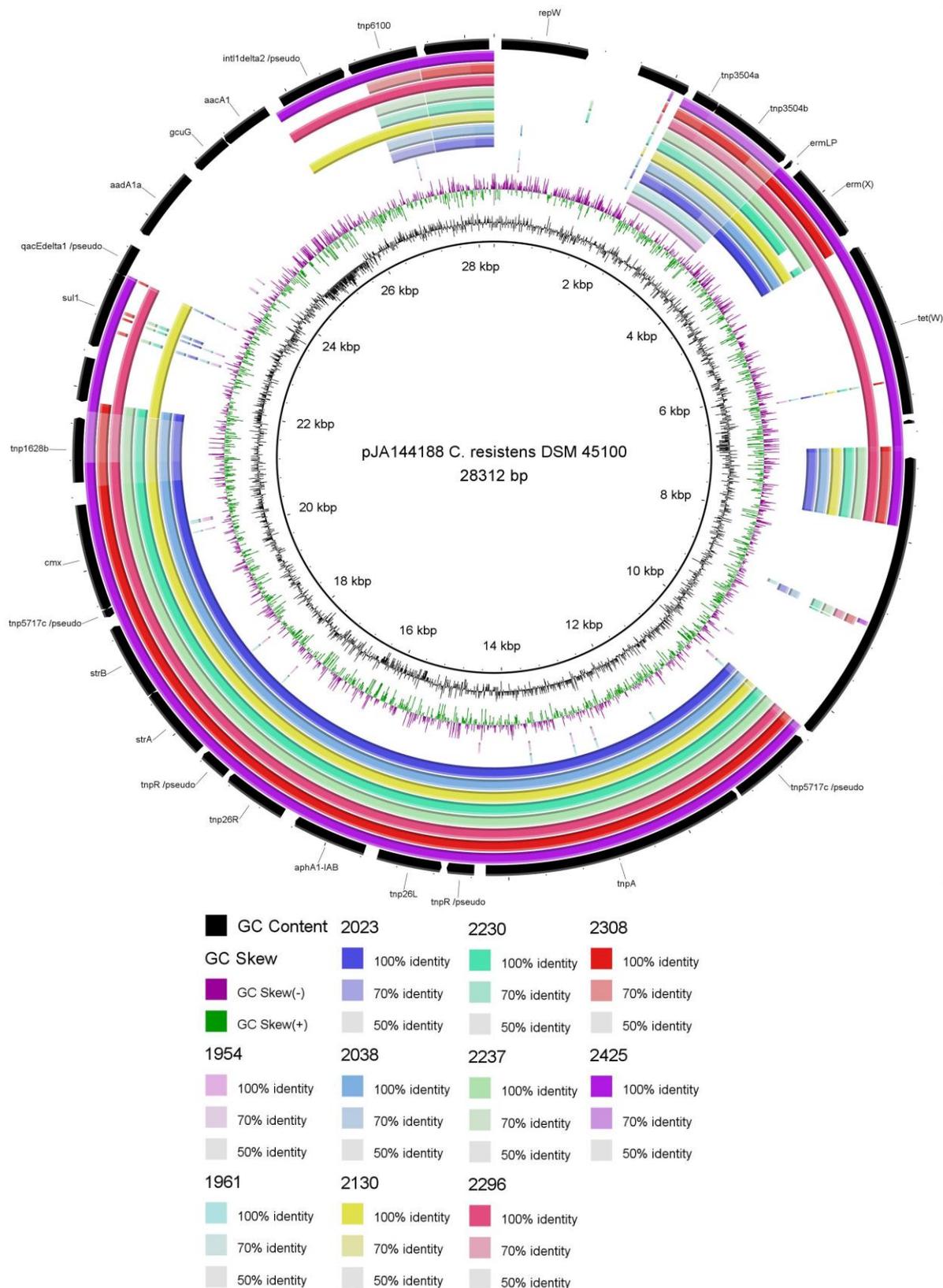
Na figura acima, podemos observar a ausência dos genes *ermX*, *cmx*, *aph(3')-Ia* (anteriormente denominado *aphA1-IAB*) e *strA* nos genomas das estirpes multissensíveis 1954 e 1961. Estes genes estão associados à resistência aos antimicrobianos MLSB, cloranfenicol, vários aminoglicosídeos e estreptomicina, respectivamente. O gene *strB*, de resistência à estreptomicina, encontra-se truncado no plasmídeo pTP10, por isso não é mostrado na **Figura 34**. As estirpes 2296 e 2425 apresentam SI pertencentes à família 256, mas que não foram classificadas como *IS1249*, pertencente à esta família. Por isso é possível observar uma certa similaridade na região das *IS1249* do plasmídeo pTP10 com os genomas dessas duas estirpes.

Na comparação gerada com o plasmídeo pJA144188 da cepa tipo de *C. resistens* DSM 45100 (Genbank nº NC014167) é possível observar a presença dos genes *intI* e *sulI* nas estirpes 2130, 2296 e 2425 (**Figura 35**). O integron de classe I do plasmídeo pJA144188 carrega genes de resistência aos aminoglicosídeos (SCHRODER et al, 2012). Já os integrons de nossas estirpes não carregam cassetes gênicos de resistência. O gene *tetW*, relacionado à resistência às tetraciclínas, pode ser visualizado em duas estirpes (2296 e 2425), mas suas sequências apresentaram a deleção de uma base, ocasionando em mutação do tipo *frameshift* nas proteínas codificadas. O gene *repW* relacionado à maquinaria de replicação do plasmídeo pJA144188 não foi encontrado em nossas estirpes.

Na **Figura 36**, os genomas de *C. striatum* foram comparados com o plasmídeo pNG2 de *C. diphtheriae* S601 (Genbank nº AF492560), de 15.100 pb, contendo 17 regiões codificantes, mas apenas uma região de resistência. Este plasmídeo carrega o gene *ermX*, relacionado à resistência à eritromicina, flanqueado pelas *IS3504*, que provavelmente são as responsáveis por uma deleção espontânea numa região do gene, ocasionando em fenótipo sensível nesta estirpe (TAUCH et al, 2002). Na estirpe 1954, é possível observar o alinhamento de cerca de 470 nucleotídeos entre o gene *repA* do plasmídeo pNG2 com o gene codificante de uma proteína hipotética, anteriormente relatado.

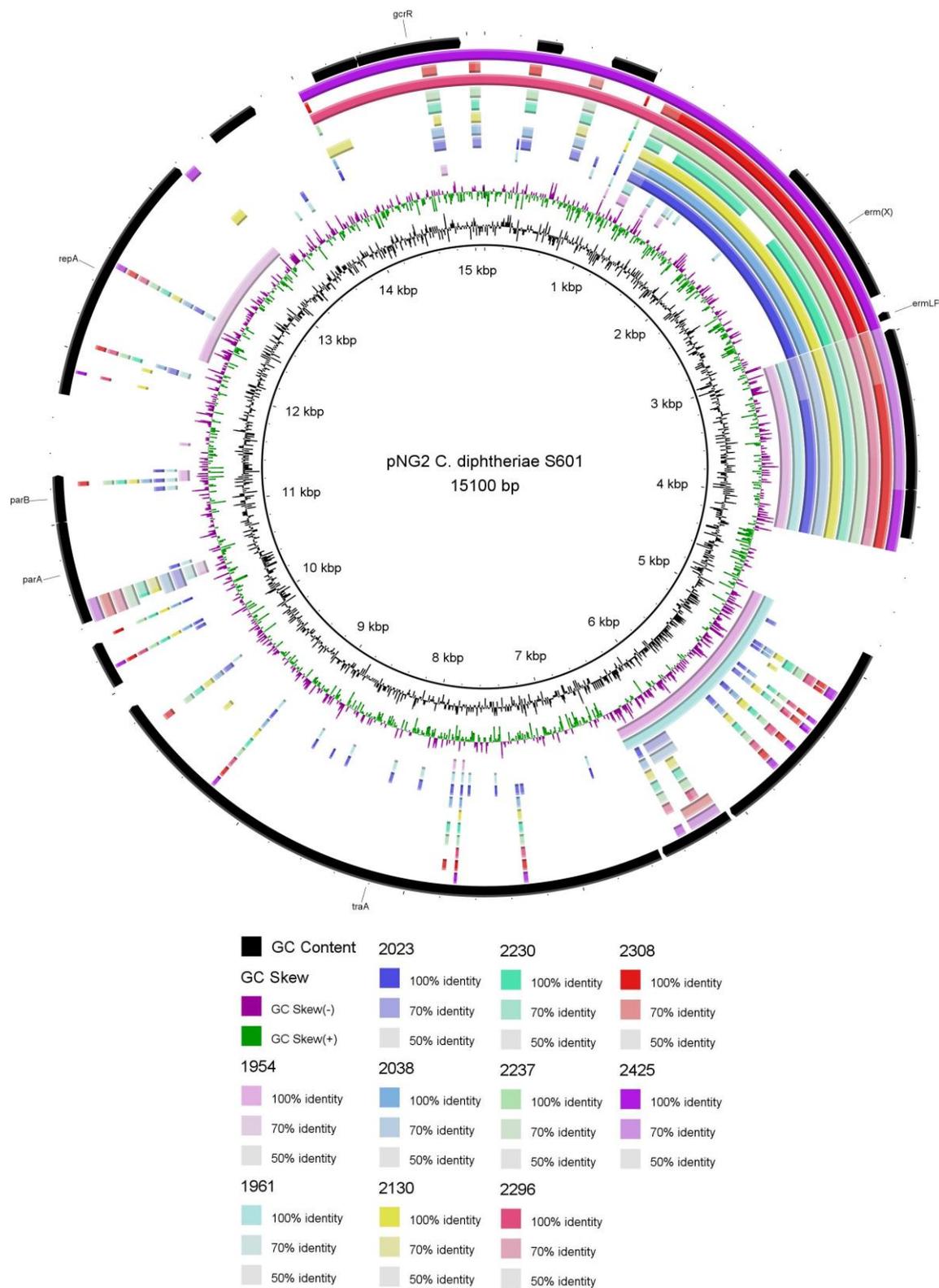
Apesar de não ter sido encontrado nenhum homólogo dos genes relacionados à replicação de plasmídeos em nossas estirpes, é possível observar nas **Figuras 34-36**, que boa parte do conteúdo genético relacionado à resistência aos antimicrobianos nos plasmídeos descritos acima está integrada nos cromossomos das estirpes de *C. striatum* deste estudo.

Figura 35 – Comparação dos genomas de *C. striatum* deste estudo com o plasmídeo pJA144188 da cepa tipo de *C. resistens* DSM 45100. Imagem gerada no programa BRIG utilizando o algoritmo *Blastn* para comparação entre o plasmídeo e os genomas. O anel preto externo representa o plasmídeo pja144188 com as suas respectivas anotações.



Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 36 – Comparação dos genomas de *C. striatum* deste estudo com o plasmídeo pNG2 de *C. diphtheriae* S601. Imagem gerada no programa *BRIG* utilizando o algoritmo *Blastn* para comparação entre o plasmídeo e os genomas. O anel preto externo representa o plasmídeo pNG2 com as suas respectivas anotações



Fonte: (Da autora, 2018).

4.7.9.4 Ilhas genômicas de resistência

Para a predição das ilhas genômicas de resistência, utilizamos o programa *GIPSY* (SOARES et al, 2016), que faz a predição de ilhas de resistência, patogenicidade, metabólicas e simbióticas. Apenas as ilhas genômicas de resistência foram estudadas. Foram consideradas as predições das ilhas classificadas como forte a normal e são apresentadas na **Figura 37**.

Não foram encontradas ilhas genômicas de resistência compartilhadas entre todos os genomas multirresistentes, nem entre os genomas dos pulsotipos I (2023 e 2308, **Figuras 37a** e **37b**, respectivamente) e VI (2230 e 2237). Em cada estirpe, foram preditas várias ilhas putativas de resistência (PRI), mas a maioria dos genes de resistência aqui estudados foram localizados fora das PRI, a exemplo da estirpe 2230, portanto, não foi realizada nenhuma representação desta estirpe. Já na estirpe 2237 (mesmo pulsotipo da 2230), três PRI foram preditas (**Figura 37c**), variando de 12 a 17 kb, carreando os genes associados à resistência aos aminoglicosídeos e ao cloranfenicol, destacado em vermelho.

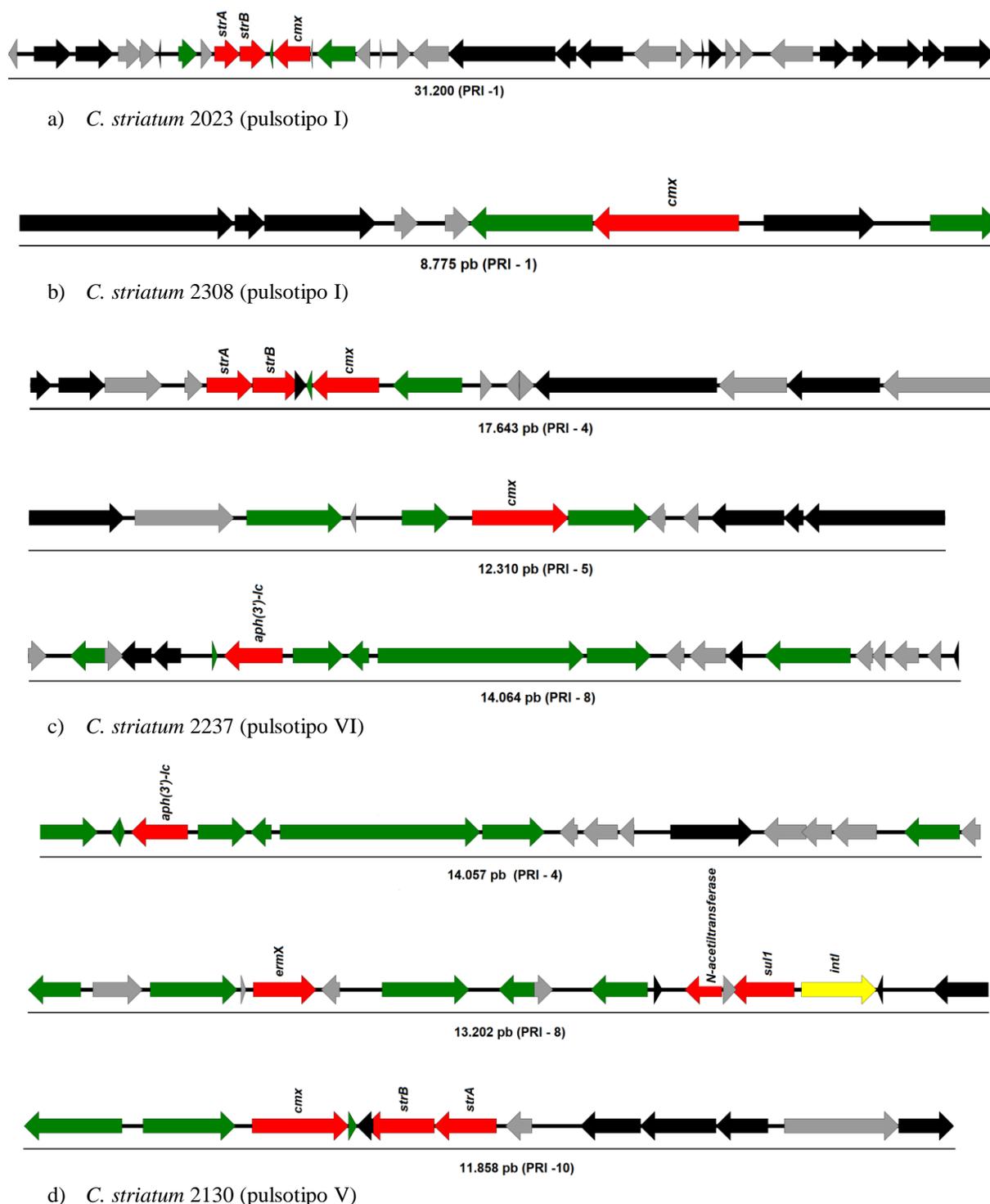
Apesar de carrear a maior ilha predita (31.200 pb), a PRI da estirpe 2023 (pulsotipo I) (**Figura 37a**) carrea o mesmo conteúdo genético da PRI-4 da estirpe 2237 (**Figura 37c**). Estas ilhas compartilham apenas os genes de resistência à estreptomicina (genes *strA-strB*) e ao cloranfenicol (gene *cmx*). O restante do conteúdo das ilhas não apresenta similaridade, com exceção das SI próximas a esses genes.

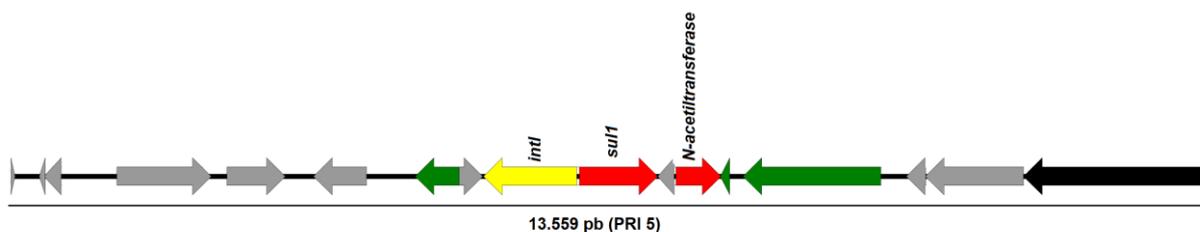
Nas **Figuras 37d** e **37e**, é possível observar que os integrons vazios das estirpes 2130 e 2296, respectivamente, encontram-se inseridos nas PRI, próximas à N-acetiltransferase, provavelmente uma nova enzima AAC.

A ilhas genômicas apresentam em média de 6 a 200 kb, podendo chegar a 600 kb (BELLANGER et al, 2014, LU; LEONG, 2018). Na estirpe 2425 foi predita a menor PRI (**Figura 37f**), com apenas 5 kb, contendo apenas o gene *ermX* associado à resistência aos antimicrobianos. Os genomas completos da espécie *C. striatum* foram recentemente publicados, mas nenhum estudo na literatura sobre ilhas genômicas em *C. striatum* foi realizado.

Os genes *tetA-tetB* e *tetW*, relacionados à resistência às tetraciclinas, não foram localizados nas PRI em todas as estirpes (**Figura 37**). Apenas nas estirpes 2130 e 2425, o gene *ermX*, relacionado à resistência aos antimicrobianos MLSB, foi encontrado em PRI (**Figuras 37d** e **37f**).

Figura 37 – Representação das ilhas genômicas de resistência putativas presentes em algumas estirpes de *C. striatum* deste estudo preditas pelo programa *GIPSY*. Em vermelho estão os genes de resistência relacionados à multirresistência de nossas estirpes: *aph(3')-Ia*, *strA-strB* (aminoglicosídeos); N-acetiltransferase, possível nova enzima acetiltransferase relacionada à resistência aos aminoglicosídeos; *cmx* (cloranfenicol); *ermX* (antimicrobianos MLSB); *sulI* (sulfonamida). Em amarelo os genes codificantes da integrase de classe 1. Em cinza as proteínas hipotéticas. Em verde, transposases e IS. Em preto, as demais sequências codificantes.

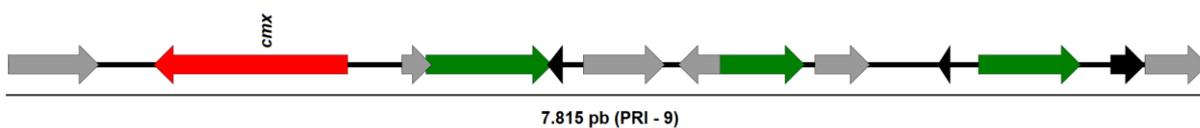




e) *C. striatum* 2296 (pulsotipo VII)

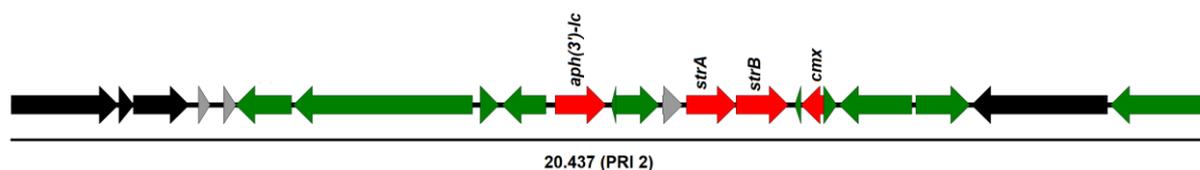


f) *C. striatum* 2425 (pulsotipo IX)



g) 2038 (pulsotipo II)

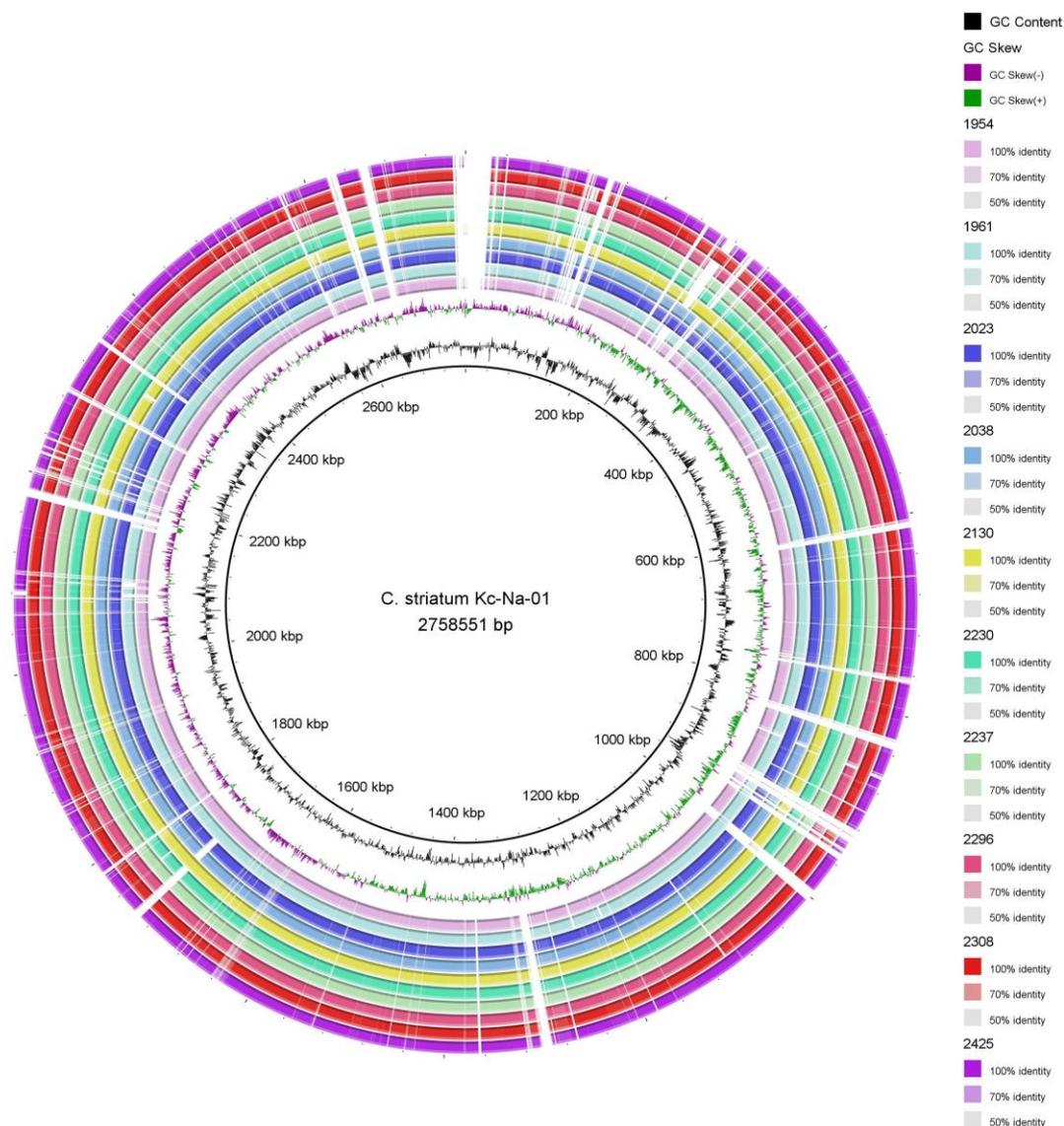
Fonte: (Da autora, 2018).



Em todas as ilhas é possível observar a presença de genes relacionados à mobilidade (destacados em verde), como transposases e SI (não detalhadas). Várias proteínas hipotéticas (destacadas em cinza) foram encontradas, além de vários genes pertencentes à MFS e relacionados ao transporte de metais, como zinco e arsênio.

Na **Figura 38**, é possível observar a ausência de várias regiões em nossas estirpes de *C. striatum*, em comparação com a estirpe isolada de animal (*C. striatum* Kc-Na-01), usada como referência para a predição das ilhas genômicas. No entanto, a maioria das ilhas de resistência preditas em nossas estirpes não carregavam os genes de resistência aqui estudados.

Figura 38 – Comparação dos genomas de *C. striatum* deste estudo com a estirpe *C. striatum* Kc-Na-01. Imagem gerada no programa *BRIG* utilizando o algoritmo *Blastn* para comparação entre as estirpes de *C. striatum* deste estudo e a estirpe *C. striatum* Kc-Na-01 (anel circular interno preto), utilizada como referência para a predição de ilhas genômicas pelo programa *GIPSy*.



Fonte: (Da autora, 2018).

4.7.9.5 Fagos

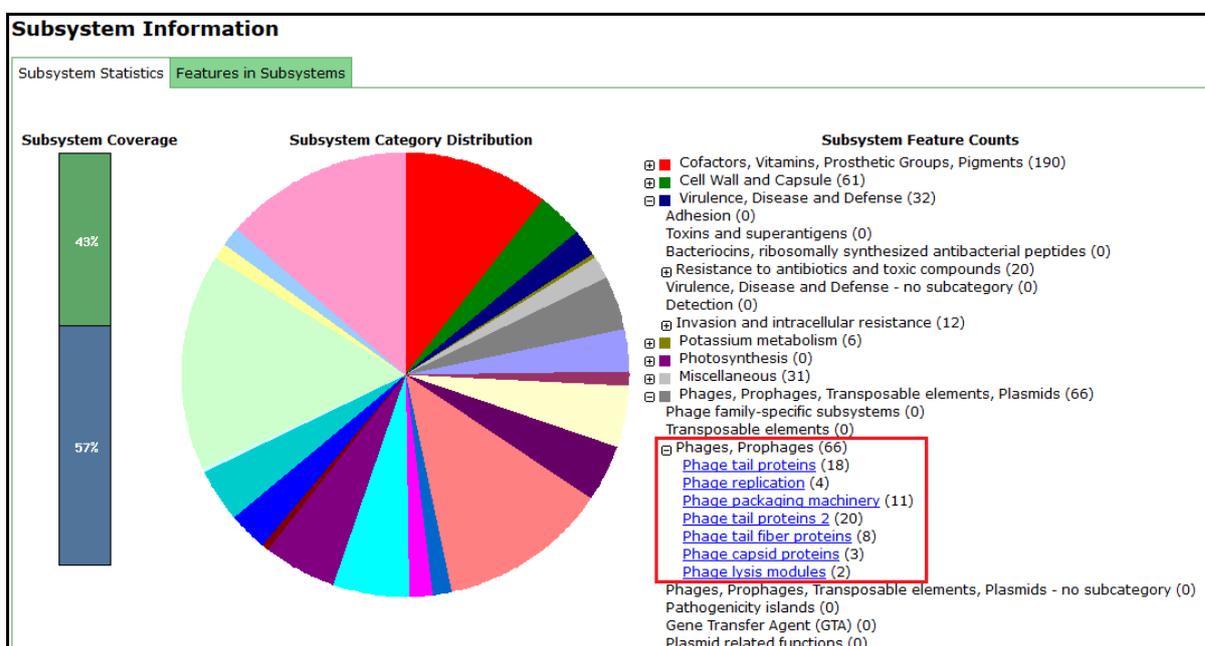
Os fagos integrados nos cromossomos bacterianos são denominados profagos. Os genomas bacterianos podem conter um valor maior que 20% de genes de bacteriófagos funcionais e não funcionais e as sequências do profago podem ser responsáveis por uma

fração significativa da variação dentro das espécies ou grupos bacterianos. A presença de sequências de profago também pode permitir que algumas bactérias adquiram resistência a antibióticos, para existir em novos nichos ambientais, para melhorar a adesão ou para tornarem-se patogênicos (CASJENS, 2003, ZHOU et al, 2011).

Os bacteriófagos são importantes em muitas espécies bacterianas, incluindo *C. diphtheriae*, que carregam o gene *tox*, codificante da toxina diftérica (TROST et al, 2012). As regiões de profagos são desconhecidas em *C. striatum* e pouco estudadas no gênero *Corynebacterium*.

Uma vez que alguns genes foram categorizados na subcategoria fagos e profagos utilizando a anotação automática do servidor RAST (Figura 39), utilizamos o algoritmo PHASTER para anotação e identificação destes genes em nossas estirpes.

Figura 39 – Categorização funcional dos genes de *C. striatum* anotados pelo servidor RAST. Em destaque os genes anotados na subcategoria fagos e profagos na estirpe 1954.

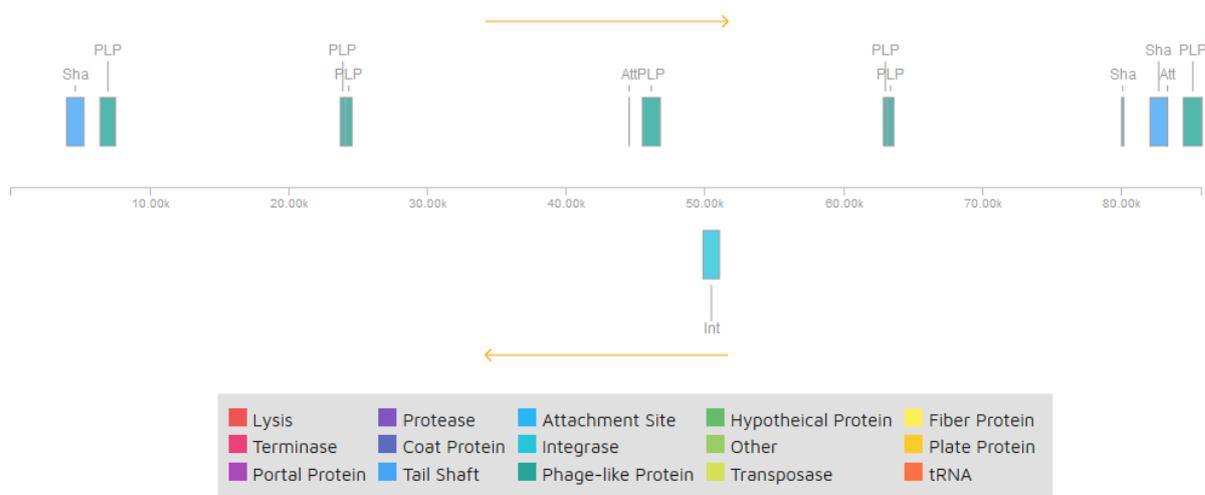


Fonte: (Da autora, 2018).

Apenas a estirpe 1954 apresentou duas regiões intactas de profagos (Figuras 40a e 40b), sendo a primeira com tamanho de 85,6 kb e conteúdo GC de 32,84%. A segunda região apresentou tamanho de 131,4 kb e conteúdo GC de 14,29%. Os conteúdos GC das regiões de profagos 1 e 2 são bem inferiores ao conteúdo GC do genoma da estirpe 1954, que exibiu um

valor de 59,3% (**Tabela 7**). Nas demais estirpes estudadas, apenas regiões incompletas de profago foram encontradas.

Figura 40 – Profagos intactos encontrados na estirpe 1954 pelo algoritmo *Phaster* mostrando apenas os produtos gênicos anotados.



a) profago 1 (tamanho 85,6 kb)



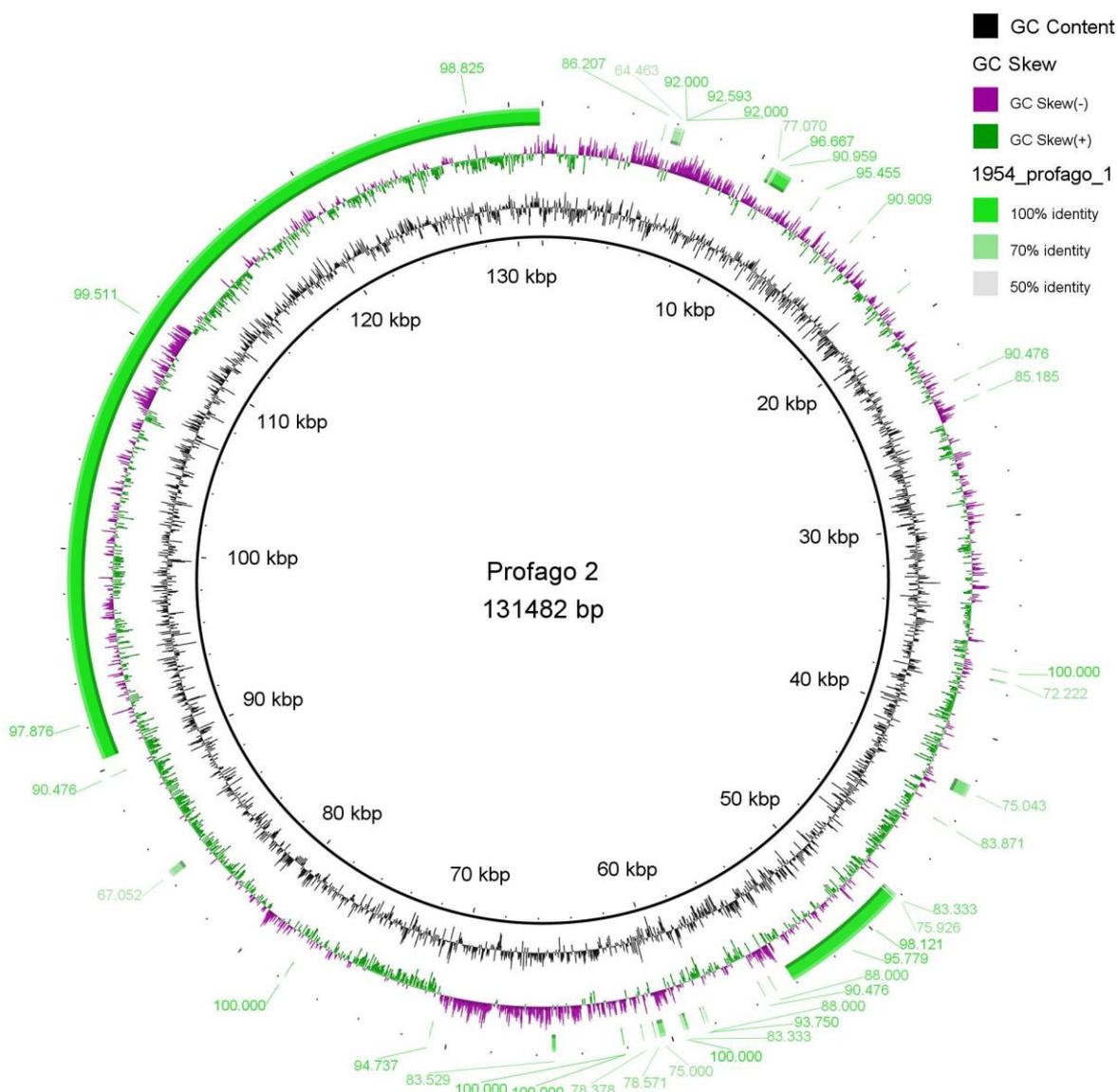
b) profago 2 (tamanho 131,4 kb)

Fonte: (Da autora, 2018).

Estas duas regiões intactas compartilham cerca de 40 kb com identidade acima de 99% (**Figura 41**). Dentro dessa região de 40 kb, cerca de 18 kb alinham em 97% de identidade com a sequência de um fago incompleto (tamanho de 35,7 kb) encontrado no genoma da

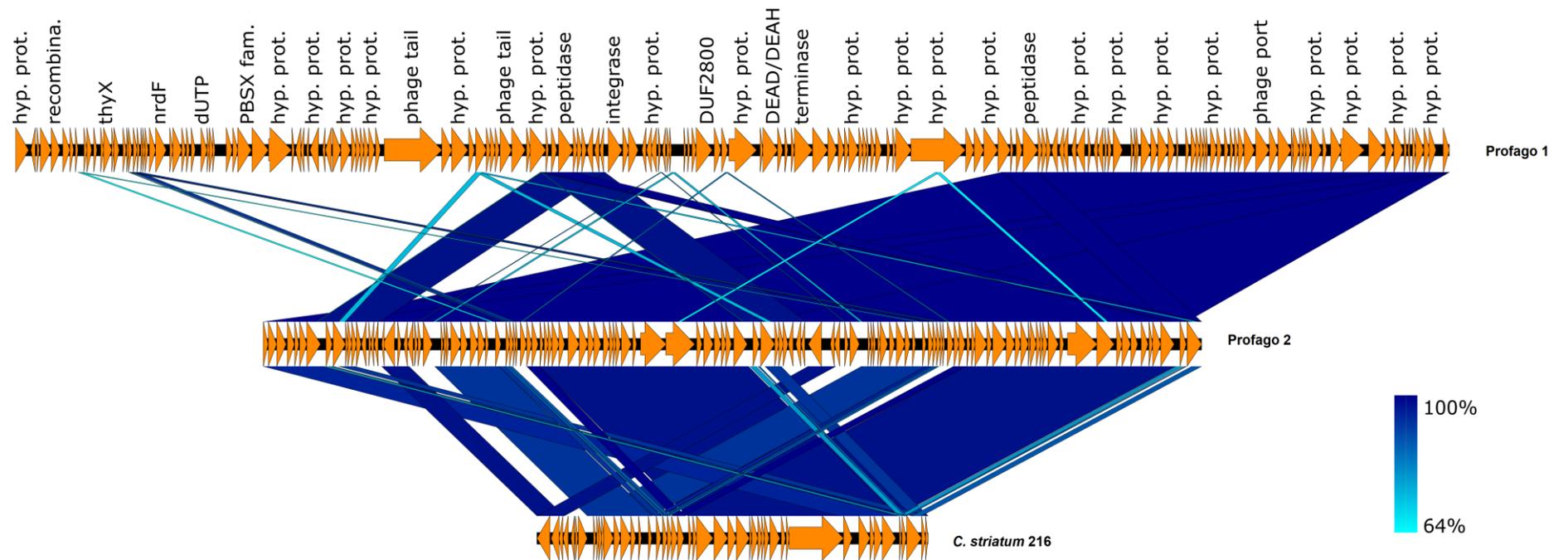
estirpe multirresistente *C. striatum* 216 (Genbank nº CP024932) (**Figura 42**). Esta estirpe isolada nos Estados Unidos apresenta duas regiões de fagos incompletas e tamanhos distintos (35,7 kb 12,9 kb).

Figura 41 – Comparação entre os genomas dos profagos 1 e 2 encontrados na estirpe 1954. O círculo interno representa a sequência nucleotídica do genoma do profago 2 (131,4 kb). Em comparação, segmentos em verde, no círculo externo, representa o genoma do profago 1 (85,3 kb). Imagem gerada no programa *BRIG* utilizando o algoritmo *Blastn*.



Fonte: (Da autora, 2018).

Figura 42 – Comparação entre os genomas dos profagos 1 e 2 encontrados na estirpe 1954 com o fago incompleto da estirpe multirresistente de *C. striatum* 216 (35,7 kb). As sequências nucleotídicas dos profagos 1 e 2 (estirpe 1954) e da região incompleta do profago da estirpe *C. striatum* 216 (de cima para baixo, respectivamente). Imagem gerada a partir da comparação das regiões acima mencionadas pelo alinhamento local (algoritmo *Blastn*) utilizando o programa *EasyFig*.

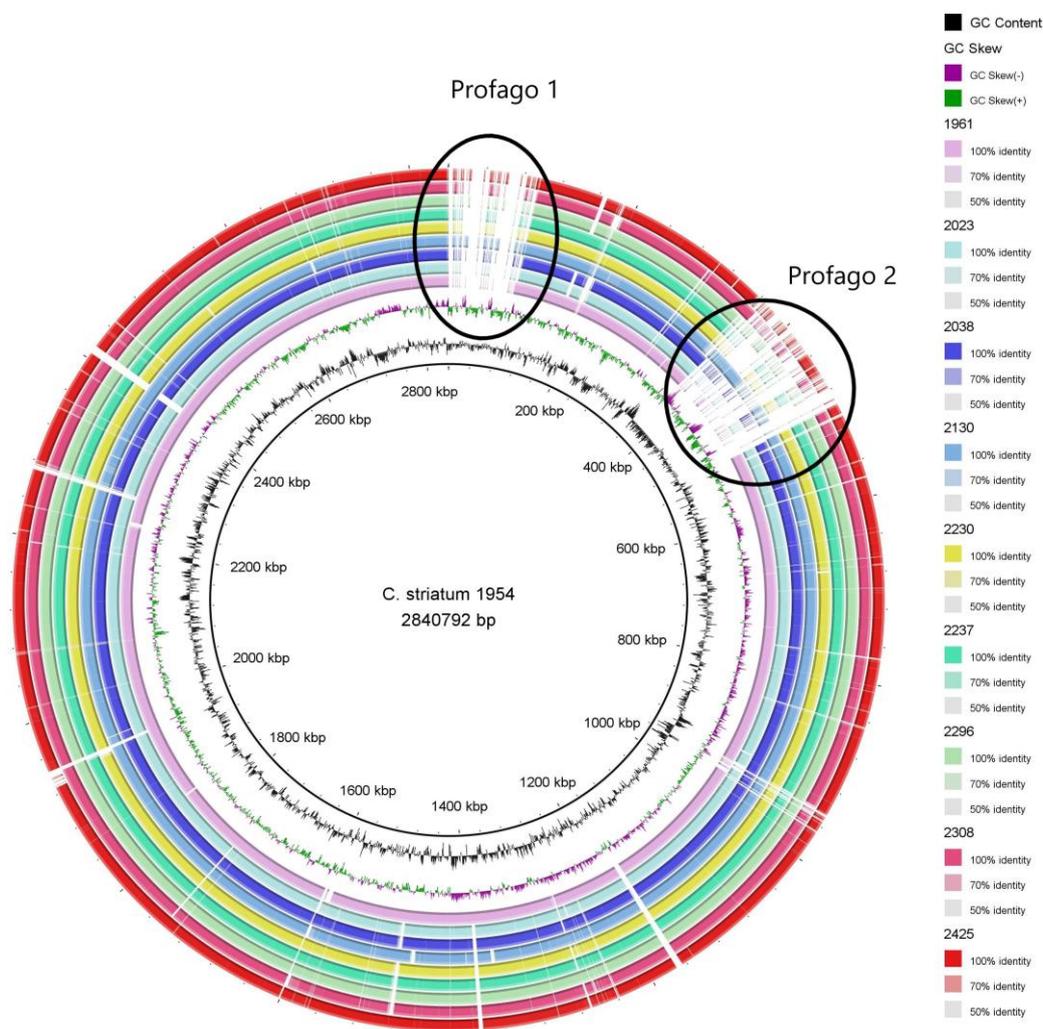


Fonte: (Da autora, 2018).

A maioria dos produtos gênicos anotados nos profagos 1 e 2 da estirpe 1954 são proteínas relacionadas a fagos e proteínas hipotéticas. Dentre os produtos gênicos anotados estão as proteínas da família das metalo-endopeptidases, como a peptidase M23 e ImmA/IrrE. A primeira é uma endolisina dependente de zinco, encontrada em fagos de diversos gêneros bacterianos. Em nossas estirpes, a peptidase M23 foi detectada em vários profagos incompletos. A proteína ImmA/IrrE é descrita no Pfam como uma metalo-peptidase encontrada em bactérias e vírus com função desconhecida (GRABOWSKA et al, 2015).

Na **Figura 43**, o genoma da estirpe 1954 foi usado como referência e comparado com os genomas das demais estirpes. A região dos dois profagos encontra-se incompleta nas demais estirpes.

Figura 43 – Comparação dos genomas de *C. striatum* evidenciando as duas regiões de profagos na estirpe 1954. O círculo interno preto representa a sequência nucleotídica do genoma de *C. striatum* 1954. Imagem gerada no programa *BRIG* utilizando o algoritmo *Blastn*.



Nas estirpes 2230 e 2237 (pulsotipo VI) foram encontrados profagos incompletos de mesmo tamanho (26,6 kb), que compartilham 100% de identidade. Estes profagos incompletos foram preditos como ilha putativa de resistência em ambas as estirpes, de aproximadamente 70 kb (dados não mostrados no tópico “Ilhas Genômicas de Resistência”). Nesta região de 70 kb, encontram-se várias proteínas associadas a fagos, como recombinase, integrase, terminase, nuclease, entre outras e o gene *BLR* (regulador negativo da expressão da beta-lactamase), além de genes codificantes de proteínas pertencentes à MFS.

Apesar de duas regiões de profagos intactas relativamente grandes terem sido encontradas na estirpe multissensível 1954, nenhum gene relacionado à virulência ou resistência aos antimicrobianos foi encontrado nessas regiões.

4.7.9.6 Sistema CRISPR-Cas

Segundo Ostría-Hernández et al (2015), a habilidade das bactérias de se adaptarem a novos ambientes se dá em grande parte pela aquisição de plasmídeos pela transferência horizontal de genes, contudo isso deve ocorrer de forma balanceada a fim de que a bactéria em questão não adquira novos elementos genéticos que aumentem seu gasto energético excessivamente para a manutenção do mesmo. Quando procaríotos apresentam o sistema CRISPR-Cas em seu genoma, estes organismos conseguem sobreviver à infecção inicial por fagos ou plasmídeos, devido a capacidade de obter um pequeno fragmento de DNA ou RNA invasor e, assim iniciar o maquinário celular para degradá-los. Desta forma, quando o material genético invasor é danoso, um sistema CRISPR-Cas representa uma vantagem seletiva, todavia quando plasmídeos concedem, por exemplo, resistência a antibióticos, tal inibição pode representar uma grande desvantagem.

Até o momento não encontramos estudos sobre o sistema CRISPR-Cas em *C. striatum*. Iniciamos a análise do sistema CRISPR-Cas avaliando o *locus* Cas e o CRISPR, entretanto outros elementos deste sistema como as sequências líder e os espaçadores assim como a localização do sistema no genoma serão posteriormente estudados. Os dez genomas de *C. striatum* avaliados neste estudo foram submetidos ao banco de dados *CRISPRfinder* para pesquisa por elementos CRISPR. Nossa análise mostrou que o genoma da estirpe 1954 não apresentou a região do sistema CRISPR-Cas (**Tabela 29**).

Tabela 29 - Resultados encontrados pelo *CRISPRfinder*.

Estirpes	Contig	Sistema Cas/ Classificação Makarova et al (2015)	Sequência Consenso	Tamanho/ Nº de espaçadores	Similaridade dos espaçadores (%)
1954	-	-	-	-	-
1961	6	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC * 28pb - 16 repetições	939 pb (15)	13 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Rivularia sp.</i> PCC 7116 (100,0) 1 espaçador - <i>Calothrix sp.</i> PCC 6303 (94,7)
	9	-	GGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 28 pb - 43 repetições	2591 pb (42)	41 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928 (95,0)
2023	15	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 28 pb - 19 repetições	1123 pb (18)	17 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941 (95,2)
	72	-	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 28 pb - 5 repetições, 1 sequencia com o primeiro nucleotídeo diferente	333 pb (5)	5 espaçadores desconhecidos
	17	Cas2, Cas1, Cas3, Cas6, Cas5, Cas7e, Cse2, Cse1 tipo I'	GGAAATACCTCCGCGTGCGCGGAGAAGAG 29 pb - 10 repetições	606 pb (9)	8 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Hymenobacter sp.</i> PAMC 26554 (100,0)
	27	-	GGAAATACCTCCGCGTGCGCGGAGAAGAG 29 pb - 12 repetições, 4 sequencias com nucleotídeos diferentes	961 pb (15)	15 espaçadores desconhecidos

Tabela 29 (continuação)

Resultados encontrados pelo *CRISPRfinder*.

Estirpes	Contig	Sistema Cas/ Classificação Makarova et al (2015)	Sequência Consenso	Tamanho/ Nº de espaçadores	Similaridade dos espaçadores (%)
2038	4	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 28 pb - 52 repetições	3140 pb (51)	47 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>Thermophilum pendens</i> Hrk 5 (94,7) 1 espaçador – <i>Eubacterium limosum</i> KIST612 (92,0) 1 espaçador – <i>R. castenholzii</i> DSM 13941 (95,2) 1 espaçador – <i>Haloferax volcanii</i> DS2 (100,0)
	6	Cas2, Cas1, Cas3, Cas6, Cas5, Cas7e, Cse2, Cse1/ tipo I'	CTCTTCTCCGCGCACGCGGAGGTATTTC 29 pb - 60 repetições	3628 pb (59)	57 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i> GCF_001855335(95,4) 1 espaçador - <i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078 (100,0)
2130	21	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ I-E	GGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 28 pb - 21repetições	1248 pb (20)	19 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Methanothermobacter wolfeii</i> GCF_900095815 (100,0)
	10	-	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 28 pb - 54 repetições	3260 pb (53)	48 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>C. simulans</i> GCF001586235 (96,3) 1 espaçador – <i>Thermus thermophilus</i> JL-18 (100,0) 1 espaçador – <i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i> 177R1B (94,7) 1 espaçador – <i>Burkholderia plantarii</i> GCF_001411805 (100,0) 1 espaçador – <i>H. volcanii</i> DS2 (100,0)
	35	-	AGTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 29 pb - 6 repetições, 3 sequências com o primeiro nucleotídeo trocado)	522 pb (8)	8 espaçadores desconhecidos

Tabela 29 (continuação)

Resultados encontrados pelo *CRISPRfinder*.

Estirpes	Contig	Sistema Cas/ Classificação Makarova et al (2015)	Sequência Consenso	Tamanho/ Nº de espaçadores	Similaridade dos espaçadores (%)
2130	36	-	GGGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 29 pb (12 repetições, 3 sequências com o primeiro nucleotídeo trocado)	950 pb (15)	13 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>Thermus thermophilus</i> JL-18 (100,0) 1 espaçador – <i>C. simulans</i> GCF001586235 (96,3)
	52	-	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 28 pb - 14 repetições	823 pb (13)	13 espaçadores desconhecidos
	58	-	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 28 pb - 5 repetições	271 pb (4)	4 espaçadores desconhecidos
2230	15	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 28 pb - 45 repetições	2713 pb (44)	41 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>R. castenholzii</i> DSM 13941 (95,2) 1 espaçador – <i>E. limosum</i> KIST612 (92,0) 1 espaçador – <i>T. pendens</i> Hrk 5 (94,7)
	28	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GGGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 29 pb – 48 repetições	2896 pb (47)	44 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>R. castenholzii</i> DSM 13941 (95,2) 1 espaçador – <i>E. limosum</i> KIST612 (92,0) 1 espaçador – <i>T. pendens</i> Hrk 5 (94,7)
2237	4	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 28 pb - 48 repetições	2896 pb (47)	44 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>R. castenholzii</i> DSM 13941 (95,2) 1 espaçador – <i>E. limosum</i> KIST612 (92,0) 1 espaçador – <i>T. pendens</i> Hrk 5 (94,7)

Tabela 29 (continuação)Resultados encontrados pelo *CRISPRfinder*.

Estirpes	Contig	Sistema Cas/ Classificação Makarova et al (2015)	Sequência Consenso	Tamanho/ Nº de espaçadores	Similaridade dos espaçadores (%)
2296	15	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCC 29 pb - 101 repetições	6128 pb (100)	92 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Geobacillus sp.</i> WCH70 (100,0) 1 espaçador - <i>Chloroflexus sp.</i> Y-400-fl (94,7) 1 espaçador - <i>Veillonella parvula</i> GCF_002005185 (100,0) 1 espaçador - <i>Nostoc sp.</i> NIES-3756 GCF_001548375 (95,0) 1 espaçador - <i>Sulfolobus sp.</i> A20 GCF_001719125 (100,0) 1 espaçador - <i>Rivularia sp.</i> PCC 7116 (90,9) 1 espaçador - <i>Thermus oshimai</i> JL-2 (100,0) 1 espaçador - <i>Thermodesulfator indicus</i> DSM 15286 (95,0)
	2	Cas2, Cas1, Cas3, Cas6, Cas5, Cas7e, Cse2, Cse1/ tipo I'	GGAAATACCTCCGCGTGCGCGGAGAAGAG 29 pb - 59 repetições	3567 pb (58)	56 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i> GCF_001602115(95,5) 1 espaçador - <i>Fervidobacterium pennivorans</i> DSM 9078 (100,0)
2308	18	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GGGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 29 pb - 118 repetições	7167 pb (117)	111 espaçadores -desconhecidos 1 espaçador - <i>Porphyromonas gingivalis</i> GCF_001263815 (90,9) 1 espaçador - <i>Thiocystis violascens</i> DSM 198 (91,3) 1 espaçador - <i>Bacillus tusciae</i> DSM 2912 (94,7) 1 espaçador - <i>R. castenholzii</i> DSM 13941 (95,2) 1 espaçador - <i>E. limosum</i> KIST612 (92,0) 1 espaçador - <i>T. pendens</i> Hrk 5 (94,7)

Tabela 29 (continuação)Resultados encontrados pelo *CRISPRfinder*.

Estirpes	Contig	Sistema Cas/ Classificação Makarova et al (2015)	Sequência Consenso	Tamanho/ Nº de espaçadores	Similaridade dos espaçadores (%)
	19	-	TGGAAATACCTCCGCGTGCGCGGAGAAGAG 30 pb - 6 repetições, 2 sequências com o primeiro nucleotídeo trocado	353 pb (5)	4 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>A. acidipropionici</i> GCF_001602115 (95,4)
	27	-	GGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 28pb - 47 repetições, 1 sequências com o primeiro nucleotídeo trocado	2833 pb (46)	44 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>P. gingivalis</i> GCF001263815 (91,3) 1 espaçador – <i>T. violascens</i> DSM 198 (91,3)
2308	35	-	GGGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 29 pb - 38 repetições	2292 pb (37)	34 espaçadores -desconhecidos 1 espaçador – <i>T. pendens</i> Hrk 5 (94,7) 1 espaçador - <i>Bacillus tusciae</i> DSM 2912 (94,7) 1 espaçador – <i>E. limosum</i> KIST612 (92,0)
	45	-	GGCTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 28 pb - 20 repetições	1188 pb (19)	18 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>R. castenholzii</i> DSM 13941 (95,2)
	49	-	GGAAATACCTCCGCGTGCGCGGAGAAGAG 29 pb - 5 repetições	279 pb (4)	4 espaçadores desconhecidos
2425	17	-	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCCC 29 pb - 46 repetições	2772 pb (45)	39 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Veillonella parvula</i> GCF_002005185 (100,0) 1 espaçador - <i>Nostoc</i> sp. -3756 GCF_001548375 (95,00) 1 espaçador - <i>Sulfolobus</i> sp. A20 GCF_001719125 (100,0) 1 espaçador - <i>Rivularia</i> sp. PCC 7116 (90,91) 1 espaçador – <i>Thermus oshimai</i> JL-2 (100,0) 1 espaçador – <i>T. indicus</i> DSM 15286 (95,00)

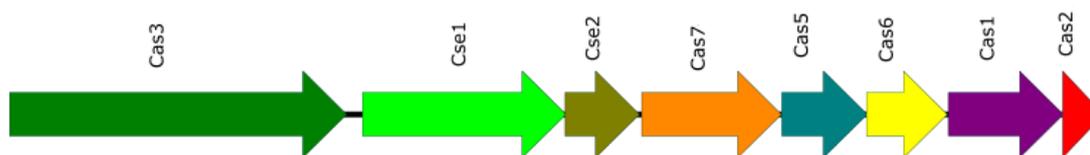
Tabela 29 (continuação)Resultados encontrados pelo *CRISPRfinder*.

Estirpes	Contig	Sistema Cas/ Classificação Makarova et al (2015)	Sequência Consenso	Tamanho/ Nº de espaçadores	Similaridade dos espaçadores (%)
2425	9	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GTCCGCCCCGCGTAAGCGGGGATGAGCCC 29 pb - 56 repetições	3384 pb (55)	53 espaçadores desconhecidos 1 espaçador - <i>Geobacillus</i> sp. WCH70 (100,0) 1 espaçador - <i>Chloroflexus</i> sp. Y-400-fl (94,7)
216	-	Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1, Cas2/ tipo I-E	GGTCATCCCCGCTTACGCGGGGCGGAC 28 pb - 77repetições A primeira sequencia tem um nucleotídeo diferente (C)	4723 pb (77)	66 espaçadores desconhecidos 1 espaçador – <i>C. urealyticum</i> DSM 7109(89,65) 1 espaçador - <i>Dokdonella koreensis</i> GCF_001632775 (91,3) 1 espaçador – <i>C. glutamicum R</i> (100,0) 1 espaçador – <i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779 (94,7) 1 espaçador - <i>Thermobifida fusca</i> Y0 X(100,0) 1 espaçador - <i>Actinomyces</i> sp. GCF001278845 (94,7) 1 espaçador – <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060 (94,7) 1 espaçador - <i>Sulfolobus islandicus</i> GCF_000245095(100,0) 1 espaçador – <i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (95,0) 1 espaçador - <i>Methylomonas</i> sp. DH-1 GCF_001644685 (94,4) 1 espaçador - <i>Azospirillum</i> sp. B510 (100,0)

Fonte: (Da autora, 2018).

O sistema CRISPR-Cas em 9 genomas apresentou uma região *cluster* com o *locus cas* do tipo I-E, segundo a classificação de Makarova et al (2015), onde o *locus Cas* é composto por oito genes organizados na seguinte ordem: Cas3, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6, Cas1 e Cas2 (**Figura 44**).

Figura 44 – Região *cluster* com o *locus Cas* tipo I-E encontrado em nove estirpes. Subtipo I-E da região *cluster* do *locus Cas*, segundo a classificação de Makarova et al. (2015)



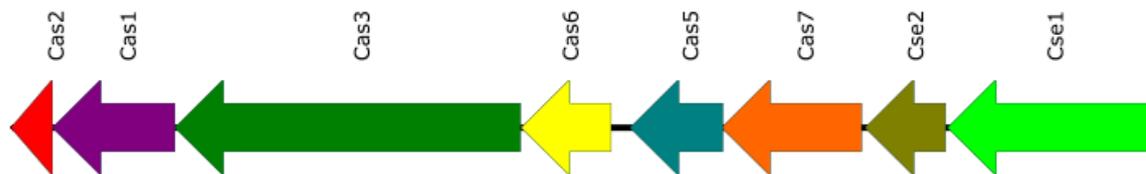
Fonte: (Da autora, 2018).

Os genomas das estirpes 2023, 2038, 2230 e 2308 apresentaram duas regiões com sistema CRISPR-Cas. O genoma da estirpe 2230 apresentou dois *locus Cas* do tipo I-E, sendo que em uma região não foi observado o gene Cas3, e sim, uma transposase da família ISL3 onde seria a localização deste gene. A presença do *locus Cas* adicional em um local diferente no genoma foi também descrita em estirpes de *C. diphtheriae* (HIDALGO-CANTABRANA et al, 2017, SANGAL; FINERAN; HOSKISSON, 2013).

A análise comparativa do *locus Cas* do tipo I-E das 9 estirpes de *C. striatum* mostrou que a região de aproximadamente 8.963 pb, identificada nos genomas das nove estirpes se encontra conservada apresentando similaridade acima de 99,34% entre si. Esta região tem similaridade acima de 99% com o *locus Cas* das estirpes de *C. striatum* 215 e 216 e de 97% com *C. simulans* estirpe Wattiau (cobertura de 100%).

Em três genomas (2023, 2038 e 2308) além da região do sistema CRISPR-Cas com *locus Cas* do tipo I-E, outro *locus Cas* com um arranjo genético diferente que denominamos de Cas tipo I' foi observado, onde o gene *cas3* se encontra entre os genes *cas1* e *cas6* (**Figura 45, Tabela 29**). Diferentes arranjos do *locus Cas* do tipo I-E também foi encontrado em genomas de *C. diphtheriae* (SANGAL; FINERAN; HOSKISSON, 2013) e *C. pseudotuberculosis* (PARISE, 2015).

Figura 45 - Região *cluster* com o *locus* Cas tipo I' encontrado nos genomas das estirpes 2023, 2038 e 2308



Fonte: (Da autora, 2018).

A análise comparativa do *locus* Cas do tipo I' de aproximadamente 8.716 pb, detectado em 3 estirpes (2023, 2038 e 2308), também se encontra conservado com similaridade acima de 99,97% entre si e similaridade de 98% (cobertura de 100%) com as estirpes *C. striatum* Kc-Na-01 e *C. simulans* PES-1 (Genbank nº CP014634). As sequências nucleotídicas dos *locus* Cas tipo I-E e I' não apresentaram similaridade, isto sugere que foram adquiridas em eventos genéticos distintos. A avaliação do *locus* Cas tipo I' será realizada para verificar se este é uma variante do tipo I-E ou outro subtipo do tipo I.

Resumindo, nos genomas das estirpes analisadas verificamos a presença de apenas uma região do sistema CRISPR-Cas do tipo I-E em cinco estirpes (1961, 2130, 2037, 2096 e 2425), sendo que na estirpe 2230 encontramos duas regiões semelhantes do sistema CRISPR-Cas do tipo I-E. Nas estirpes 2023, 2038 e 2308 duas regiões do sistema CRISPR-Cas com *locus* Cas diferentes: tipo I-E e tipo I'.

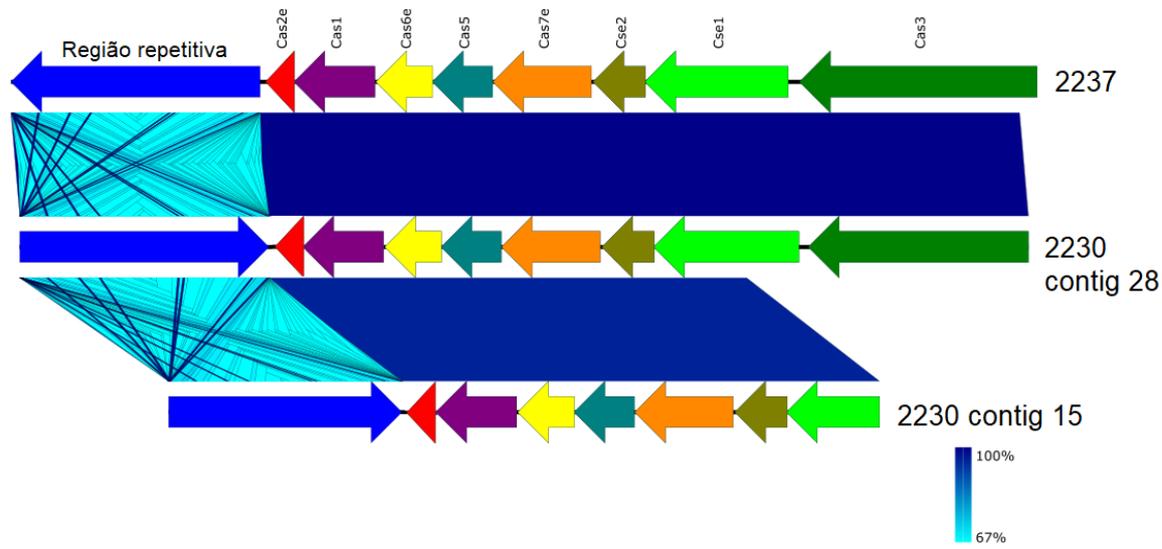
Segundo alguns autores, nem todos os *loci* CRISPR têm genes *cas* adjacentes, sendo possível que apenas o subconjunto de *locus* CRISPR que possuem genes *cas* adjacentes sejam funcionalmente ativos e os demais sejam inativos, ou que um conjunto de proteínas Cas seja suficiente para a atividade de *locus* CRISPR que não possuem genes *cas* adjacentes (BHAYA; DAVISON; BARRANGOU, 2011, MAKAROVA et al, 2015). Verificamos que cinco estirpes (1961, 2023, 2130, 2308 e 2425) deste estudo apresentaram também *locus* CRISPR sem os genes *cas* adjacentes (**Tabela 29**). Como nossos genomas não são completos, não temos como avaliar com certeza se estes *locus* CRISPR estão fragmentados, uma vez que regiões repetitivas podem ser colapsadas em uma única região no processo de montagem (RICKER; QIAN; FULTHORPE, 2012).

Uma avaliação preliminar dos espaçadores foi realizada e os resultados são apresentados na **Tabela 29**. A maioria dos espaçadores encontrados nas estirpes avaliadas não possui similaridade com sequências do banco de dados *CRISPRfinder* e os espaçadores

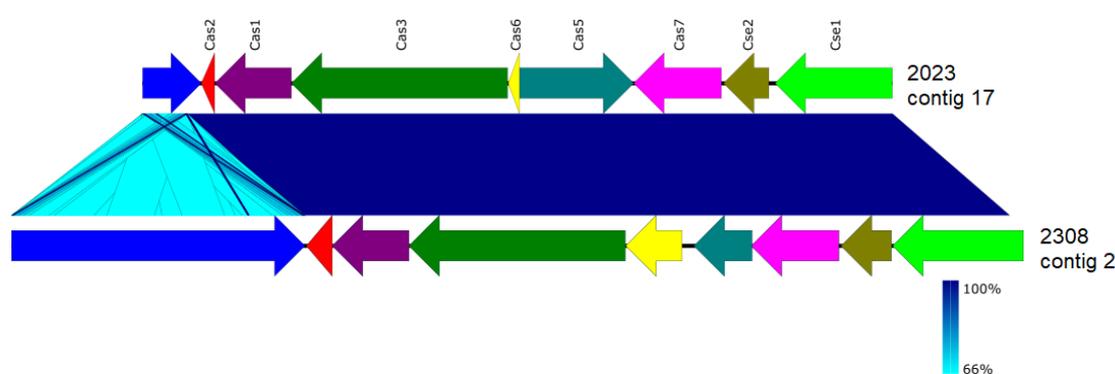
caracterizados apresentaram, na maioria, similaridade com sequências de bactérias ambientais.

Algumas análises comparativas preliminares foram realizadas com a região do sistema CRISPR-Cas de estirpes do mesmo pulsotipo e perfil de multirresistência. As estirpes 2230 e 2237 pertencem ao pulsotipo VI e ao perfil de multirresistência C (**ANEXO A**) e apresentaram o *locus* Cas tipo I-E. Estas estirpes foram isoladas do mesmo paciente, num intervalo de 1 mês. Verificamos que o genoma da estirpe 2230 isolada inicialmente apresentou duas regiões CRISPR-Cas semelhantes, sendo uma destas com regiões incompletas (**Figura 46a**). Já o genoma da 2237 apresentou apenas uma região CRISPR-Cas, cujo *locus* Cas apresenta 100% de similaridade com o *locus* Cas completo da estirpe 2230. A ausência da proteína Cas3 no *locus* Cas do *contig* 25 (estirpe 2230) corrobora com a hipótese de adaptação do genoma para garantir um gasto energético menor para célula bacteriana. Nestas análises verificamos também que os genomas das estirpes 2023 e 2308 que pertencem ao pulsotipo I e ao perfil de multiresistência A e apresentaram o *locus* Cas tipo I-E e o tipo Cas I'. Estas estirpes foram isoladas num intervalo de 48 meses. A presença das variedades do tipo I-E, no genoma dessas estirpes e na estirpe 2038 parece evidenciar uma vantagem seletiva para estas bactérias. O *locus* Cas do sistema CRISPR-Cas I' nas estirpes 2023 e 2308 é bastante conservado e apresenta 100% de similaridade, como é possível observar na **Figura 46b**.

Figura 46 – Análise comparativa do sistema CRISPR-Cas entre as estirpes 2237 e 2230, do mesmo pulsotipo. Imagens geradas pelo programa *EasyFig* a partir dos alinhamentos das sequências nucleotídicas pelo algoritmo *Blastn*.



a) Sistema CRISPR-Cas to tipo I-E nas estirpes do pulsotipo VI



b) Sistema CRISPR-Cas to tipo I' nas estirpes do pulsotipo I

Fonte: (Da autora, 2018).

O sistema CRISPR-Cas ocorre em quase metade das bactérias descritas e funciona como um mecanismo de defesa contra DNA exógenos, provenientes de fagos ou plasmídeos (OSTRIA-HERNÁNDEZ et al, 2015). Este sistema foi detectado em nove estirpes de *C. striatum*, exceto na estirpe 1954, que carrega dois profagos intactos em seu genoma. Além disso, não detectamos maquinaria de replicação de plasmídeos em nossas estirpes, apesar de boa parte do conteúdo genético do plasmídeo pTP10 ter sido localizado nos genomas de nossas estirpes. Isso corrobora a hipótese de que a aquisição de material genético ocorre de forma balanceada nas bactérias, a fim de evitar gasto energético excessivo para a manutenção de vários elementos genéticos móveis.

Estudos futuros de mapeamento e filtragem de *reads* do sequenciamento de nossas estirpes serão realizados para a correta estimativa do tamanho e localização em nossos genomas, uma vez que estes apresentam uma quantidade muito grande de elementos repetitivos, como as SI. Além disso, estudos da caracterização do tipo I' encontrado em três estirpes serão realizados.

5 CONCLUSÕES

- A tipagem molecular por PFGE revelou a permanência de *C. striatum* multirresistente do pulsotipo I e II no ambiente hospitalar, como agente de infecção invasiva;
- As análises de genes constitutivos baseadas em três esquemas de MLST descritos para corinebactérias mostraram ser mais discriminatórios para as estirpes de *C. striatum*, quando comparadas com a tipagem por PFGE, uma vez que as estirpes do pulsotipo I puderam ser diferenciadas;
- A análise utilizando os genes do esquema de MLST para *C. diphtheriae*, além de ter sido uma ferramenta útil para identificação das espécies do gênero *Corynebacterium*, também foi mais discriminatório do que as demais análises baseadas em genes empregados em esquemas de MLST para outras corinebactérias;
- As análises de taxonomia genômica aplicadas às nossas estirpes corroboraram a espécie *C. striatum*;
- A detecção dos genes de resistência aos antimicrobianos MLSB (*ermX*), aminoglicosídeos (*aph(3')-Ia*, *strA-strB*), tetraciclinas (*tetA-tetB* e *tetW*), cloranfenicol (*cmx*) e beta-lactâmicos (*bla* e *ampC*, recentemente descritos) nas estirpes de *C. striatum* é consistente com padrões de multirresistência observados nas diversas espécies de corinebactérias;
- A análise dos genomas de estirpes multirresistentes de *C. striatum* permitiu determinar o contexto dos genes de resistência e os elementos genéticos móveis relacionados a estes;
- Todos os genes de resistência estudados apresentaram contextos genômicos distintos entre as estirpes, mesmo entre àquelas do mesmo pulsotipo e paciente;
- Neste estudo foi verificado que a resistência aos aminoglicosídeos possivelmente pode estar associada a mutações encontradas na posição 1379 do gene ribossomal 16S;
- A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos, não parece estar relacionada apenas à presença dos genes *bla* e *ampC*, conforme sugerido na literatura. O gene *ampC* foi detectado no cromossomo de todas as estirpes;
- Um dado interessante observado em nossas análises é a relação do gene *bla* com a presença do regulador BLR, nunca antes descrita na literatura. O regulador BLR foi detectado em regiões incompletas de profagos em algumas estirpes. As estirpes *bla*-positivas e BLR-negativas apresentaram as maiores CIM para todos os beta-

lactâmicos testados. Já as estirpes *bla*-positivas e BLR-positivas apresentaram CIM variáveis;

- Outro dado observado neste estudo ainda não descrito na literatura é a relação da mutação na posição 353 da sequência de proteínas do gene constitutivo *rpoB* com a resistência à rifampicina em corinebactérias, um antimicrobiano amplamente utilizado para o tratamento de tuberculose no Brasil;
- Mutações no gene *folA* podem estar envolvidas na resistência aos antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprim nas estirpes (2038, 2230, 2237 e 2296) resistentes à esta droga associada. A estirpe 2296 carreadora do gene *sulI* apresentou a maior CIM encontrada para este antimicrobiano;
- Diferente do que é observado em muitas espécies bacterianas, os integrons não estão envolvidos na multirresistência em nossas estirpes, uma vez que foi detectado em apenas 2 estirpes, porém não apresentam cassetes gênicos de resistência;
- Várias SI estavam associadas aos genes de resistência adquiridos aqui estudados, algumas delas flanqueando alguns genes ou como componentes de transposons. O elevado número de SI encontrado sugere uma grande plasticidade genômica dessas estirpes, que foram isoladas de infecções invasivas em ambiente hospitalar;
- Não encontramos genes associados à maquinaria de replicação de plasmídeos. Entretanto, as estirpes multirresistentes carregam em seus cromossomos grande parte do conteúdo genético de resistência do plasmídeo pTP10 de *C. striatum*, sugerindo que este pode ter sido incorporado aos cromossomos de nossas estirpes;
- As estirpes não compartilham uma ilha genômica envolvida na multirresistência. Além disso, a maioria dos genes de resistência adquiridos em nossas estirpes não foram encontrados nas ilhas genômicas de resistência;
- O sistema CRISPR-Cas, um importante sistema de defesa contra DNA invasores, não foi encontrado apenas na estirpe 1954. As demais possuem sistema CRISPR-Cas do tipo I-E em seus genomas. Três estirpes também carregam um sistema CRISPR-Cas do tipo I que apresenta uma configuração bastante diferente deste sistema até então publicado na literatura e foram nomeados do tipo I' (desconhecido);
- As estirpes que apresentam sistema CRISPR-Cas em seus genomas não carregam fagos completos. É importante ressaltar que apenas a estirpe 1954 que não tem um sistema CRISPR-Cas apresentou dois profagos intactos, corroborando a hipótese de que

manter vários elementos genéticos na célula bacteriana representa gasto energético excessivo;

- A presença de diferentes elementos genéticos móveis demonstra a plasticidade dos genomas de *C. striatum* multirresistentes isolados de infecções nosocomiais invasivas. Isto impacta na propagação da resistência e no controle dessas infecções.

REFERÊNCIAS

ABI, R. et al. A *Corynebacterium striatum* endocarditis on a carrier of pacemaker. **Annales de Biologie Clinique**, v. 70, n. 3, p. 329-331, 2012.

ADAMS, M. D.; BISHOP, B.; WRIGHT, M. S. Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture. **Microbials Genomics**, v. 2, n. 7, p. e000062, 2016.

ADDERSON, E. E. et al. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 2, p. 136-141, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Gerência Geral de Tecnologia em Serviços. **Infecção de corrente sanguínea: orientações para prevenção de infecção primária de corrente sanguínea**. Brasília, 2010. 50 p.

AHMAD, S., MOKADDAS, E., FARES, E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 3, p. 245-252, 2002.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565-1574, 2014.

ALDUINA, R.; PISCIOTTA, A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Genome Size Estimates. In: MENGONI, A.; GALARDINI, M.; FONDI, M. **Bacterial Pangenomics – Methods in Molecular Biology**. New York: Ed. Springer, 2015. p. 1-14.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.

ALIBI, S. et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9794, 2017.

ALIKHAN, N. F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, p. 402, 2011.

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2016.

AN, X. L. et al. Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and genetic diversity of integron gene cassettes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 9, 2018.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

ANTUNES, C. A. et al. Complete closed genome sequence of nontoxicogenic invasive *Corynebacterium diphtheriae* bv. *mitis* strain ISS3319. **Genome Announcements**, v. 6, n. 5, p. e01566-17, 2017.

ARAUJO, M. R. E. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **Journal of Infection Control**, v. 1, n. 1, p. 8-19, 2012.

ARABESTANI, M. R. et al. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR. **Archive Iranian of Medicine**, v. 18, n. 2, p. 102-108, 2015.

ARNDT, D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W16-21, 2016.

AZIZ, R. K. et al. The RAST server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 8, n. 9, p. 75, 2008.

BADOTTI, F. et al. *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 106, n. 6, p. 1259–1267, 2014.

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**, v. 30, n. 4, p. 422-427, 2002.

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BARCELLOS, F. G. et al. Taxonomia bacteriana – aspectos atuais e perspectivas. In: YAMADA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M.C.; NOGUEIRA, M. A. (Org.) **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2015, p. 7-28.

BARRANGOU, R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. **Wiley Interdisciplinary Reviews – RNA**, v. 4, n. 3, p. 267-278, 2013.

BARRANGOU, R.; HORVATH, P. CRISPR: New horizons in phage resistance and strain identification. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 143–162, 2012.

BARRANGOU, R.; HORVATH, P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 17092, 2017.

BARRAUD, O. et al. Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 2078–2080, 2011.

BELLANGER, X. et al. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 720-760, 2014.

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

BELTRÁN-ARROYAVE, C.; DÍAZ-DÍAZ, A.; LOAIZA-DÍAZ, N. Osteomielitis crónica por *Corynebacterium striatum* en una adolescente. **Revista Chilena de Infectología**, v. 33, n. 6, p. 696-699, 2016.

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

BHAT, Y. et al. An unusual case of *Corynebacterium striatum* endocarditis and a review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 672-674, 2008.

BHAYA, D.; DAVISON, M.; BARRANGOU, R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptative defense and regulation. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 273-97, 2011

BIGNELL, C.; THOMAS, C. M. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 1-34, 2001.

BOLT, F. et al. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4177-85, 2010.

BOLTIN, D. et al. *Corynebacterium striatum*: a classical pathogen eluding diagnosis. **European Journal Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 49-52, 2009.

BOYD, E. F. Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage-pathogenicity island interactions. **Advance in Virus Research**, v. 82, p. 91-118, 2012.

BRANDENBURG, A. H. et al. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2089-2094, 1996.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING – BrCAST. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros dos halos**. Edição Março de 2017, Brasil, 2017.

BRANDT, C. *et al.* *In silico* serine β -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 43232, 2017.

BUSH, K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549–559, 2013.

BUSH, K. The Importance of β -lactamases to the development of new β -lactams. In: MAYERS, D. et al. **Antimicrobial Drug Resistance**. Cham, Switzerland: Ed. Springer, 2017, p. 165-175.

BUWEMBO, W. et al. Point mutations in the *folP* gene partly explain sulfonamide resistance of *Streptococcus mutans*. **International Journal of Microbiology**, v. 13, ID: 367021, 2013.

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**, v. 34, p. 39-44, 2003.

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. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 75-78, 2009.

CAPASSO, C.; SUPURAN, C. T. Sulfa and trimethoprim-like drugs-antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 379-387, 2014.

CARATTOLI, A. et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobials and Agents Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895-903, 2014.

CARTER, T. et al. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CARVER, T. et al. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics**, v. 25, n. 1, p. 119-120, 2009.

CASJENS, S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 277-300, 2003.

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

CERDENO-TÁRRAGA, A. M. et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 22, p. 6516-6523, 2003.

CHANDRASEKARAN, S.; LALITHAKUMARI, D. Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 197-200, 1998.

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.

CHEVREUX, B.; WETTER, T.; SUHAI, S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. **Proceedings of the German Conference on Bioinformatics**, p. 45-56, 1999.

CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 2, p. 316-324, 2014.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved guideline**, 2nd edn, document M45-A2. United States of America, 2010.

_____. **Performance standards for antimicrobial susceptibility tests: approved guideline**, 26th, document M100S. United States of America, 2016.

_____. **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved guideline**, 3rd edn, document M45-A3. United States of America, 2016.

COLLIS, C. M., HALL, R. M. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 19, p. 2875-2885, 1992.

COLLIS, C. M. et al. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 41-52, 1993.

COLLIS, C. M. et al. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1415-1427, 2002.

COLSTON, S. M. et al. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. **mBio**, v. 5, n. 6, p: 02136, 2014.

D'AFONSECA, V. et al. Reannotation of the *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129 genome as a new approach to studying gene targets connected to virulence and pathogenicity in diphtheria. **Open Access Bioinformatics**, v. 4, p. 1-13, 2012.

DABBS, E. R. et al. Rifampicin inactivation by *Bacillus* species. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 8, p. 815-819, 1995.

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

DALAL, A.; URBAN, C.; SEGAL-MAURER, S. Endocarditis due to *Corynebacterium amycolatum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. Pt 10, p. 1299-1302, 2008.

DANTAS, N. G. T. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 306, 2015.

DARLING, A. E.; MAU, B.; PERNA, N. T. Progressive Mauve: Multiple Genome Alignment with gene gain, loss and rearrangement. **Plos One**, v. 5, n. 6, 2010.

DAS, S. et al. *Corynebacterium* spp as causative agentes of microbial keratitis. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 100, n. 7, p. 939-943, 2016.

DEB, J. K; NATH, N. Plasmids of corynebacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, n. 175, p. 11-20, 1999.

DEL FIOLE, F. S.; AVALLONE, A. M. Uso de cloranfenicol na gestação. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 31-37, 2005.

DI, H. et al. *Providencia* in retail meats from Guangzhou, China and Osaka, Japan: prevalence, antimicrobial resistance and characterization of classes 1, 2 and 3 integrons. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 5, p. 829-835, 2018

DIAS, A. A. et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1176-1191, 2011.

DOMINGUES, S.; SILVA, G. J.; NIELSEN, K. M. Integrons: vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. **Mobile Genetic Elements**, v. 2, n. 5, p. 211-223, 2012.

DOSS, J. et al. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 50, 2017.

DURANTI, S. et al. Insights from genomes of representatives of the human gut commensal *Bifidobacterium bifidum*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 2515-31, 2015.

EGUCHI, H. et al. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginley*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 527-532, 2008.

ENCINAS, F. et al. Genomic analysis of a nontoxicogenic, invasive *Corynebacterium diphtheriae* strain from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 817-819, 2015.

FALLAHPOUR, N. et al. Overproduction of erythromycin by ultravioleta mutagenesis and expression of ermE gene in *Saccharopolyspora erythraea*. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 15, n. 7, p. 314-319, 2017.

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

FERNÁNDEZ-NATAL, M. I. et al. Draft genome sequences of *Corynebacterium kroppenstedtii* CNM633/14 and CNM632/14, multidrug-resistant and antibiotic-sensitive isolates from nodules of granulomatous mastitis patients. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, 2015.

FERNÁNDEZ-NATAL, I. et al. Phenotypic, molecular characterization, antimicrobial susceptibility and draft genome sequence of *Corynebacterium argenteratense* strains isolated from clinical samples. **New Microbe and New Infections**, v. 10, p. 116-121, 2016.

FERNANDEZ-ROBLAS, R. et al. In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, p. 453-455, 2009.

FIEBELKORN, K. R.; CRAWFORD, S. A.; JORGENSEN, J. H. Mutations in *folP* associated with elevated sulfonamide MICs for *Neisseria meningitidis* clinical isolates from five continents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 536-540, 2005.

FLUIT, A. C., SCHMITZ, F. J. Class 1 Integrons, Gene Cassettes, Mobility, and Epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 18, p. 761-770, 1999.

FLUIT, A. C., SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 10, n. 4, p. 272-288, 2004.

FOLSTER, H. et al. Characterization of streptomycin resistance in isolates of *Erwinia amylovora* in California. **Bacteriology**, v. 105, n. 10, p. 1302-1310, 2015.

FONSECA, E. L et al. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 1, n. 44, p. 303-309, 2005.

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

GALIMAND, M. et al. AAC(3)-XI, a new aminoglycoside 3-*N*-acetyltransferase from *Corynebacterium striatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5647-5653, 2015.

GEVERS, D. et al. Defining prokaryotic species re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.

GHIDE, S. et al. Catheter-related *Corynebacterium* bacteremia: should the catheter be removed and vancomycin administered? **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 153-156, 2010.

GIBREEL, A.; SKOLD, O. Sulfonamide resistance in clinical isolates of *Campylobacter jejuni*: mutational changes in the chromosomal dihydropteroate synthase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2156-2160, 1999.

GILLINGS, M. R. Integrons: past, present, and future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 257-277, 2014.

GÓMEZ-GARCÉS, J. L; ALOS, J. I.; TAMAYO, J. In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 6, p. 688-692, 2007.

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**, v. 12, n. 52, 2012.

GRABOWSKA, M. et al. High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue. **Scientific Reports**, v. 5, n. 14833, 2015.

GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. W52-7, 2007.

GUAN, X. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance – current knowledge and future perspectives. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 1, p. 20-30, 2013.

GUERRERO, M. L. F. et al. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* endocarditis successfully treated with daptomycin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 4, p. 373-379, 2012.

GUIMARÃES, A. S. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 68, 2011.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUIMARÃES, L. et al. Genome informatics and vaccine targets in *Corynebacterium urealyticum* using two whole genomes, comparative genomics, and reverse vaccinology. **BMC Genomics**, v. 16, n. suppl 5, p. S7, 2015.

GUIRAO, G. Y. et al. Implicación de los genes *ermX* en la resistencia a los macrólidos y la telitromicina de *Corynebacterium jeikeium* y *Corynebacterium amycolatum*. **Revista Espanolade Quimioterapia**, v.18, n. 3, p. 236-242, 2005.

GUPTA, S. K. et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genome. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 212-220, 2014.

GUREVICH, A. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, 2013.

HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. **EMBO reports**, v. 21, n. 5, p. 376-381, 2001.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programa for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HIDALGO-CANTABRANA, C. et al. Characterization and exploitation of CRISPR Loci in *Bifidobacterium longum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1851, 2017.

HINES, K. M. Characterization of the mechanisms of daptomycin resistance among Gram-Positive Bacterial pathogens by multidimensional lipidomics. **mSphere**, v. 2. n. 6, 2017.

HIRATA JR., R. et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 41, n. 11, p. 986-991, 2008.

HONG, H. L., KOH, H. L., LEE, A. J. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum* confirmed by 16S ribosomal RNA sequencing: a case report and literature review. **Infection and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 239-245, 2016.

HOOPER, D. C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 530-538, 2002.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, p. 12-31, 2015.

HUSSAIN, K. et al. Daptomycin-vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* native valve endocarditis. **Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports**, v. 4, n. 3, 2016.

HWANG, L. C. et al. ParA-mediated plasmid partition drive by protein pattern self-organization. **EMBO Journal**, v. 32, n. 9, p. 1238-1249, 2013.

IARIA, C. et al. Outbreak of multi-resistant *Corynebacterium striatum* infection in an Italian general intensive care unit. **The Journal of Hospital Infection**, v. 67, n. 1, p. 102-104, 2007.

ISHIWADA N. et al. Clinical and bacteriological analyses of bacteremia due to *Corynebacterium striatum*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 12, p. 790-793, 2016.

IWALOKUN, B. A. et al. Bacteriologic and plasmid analysis of etiologic agents of conjunctivitis in Lagos, Nigeria. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v.1, n. 3, p. 95-103, 2011.

JERNIGAN, R. W.; BARAN, R. H. Pervasive properties of the genomic signature. **BMC Genomics**, v. 3, n. 1, p. 23, 2002.

JNAWALI, H. N. et al. Characterization of mutations in multi-and extensive drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Republic of Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 76, n. 2, p. 187-196, 2013.

JUNQUEIRA, D. M.; BRAUN, R. L.; VERLI, H. Alinhamentos. In: VERLI, H. (Org). **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. p. 39-61.

KALINOWSKI, J. et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. **Journal of Biotechnology**, v. 104, n. 1-3, p. 5-25, 2003.

KARLIN, S.; BURGE, C. Dinucleotide relative abundance extremes: a genomic signature. **Trends Genetics**, v. 11, n. 7, p. 283-290, 1995.

KASMAN, L. M.; WHITTEN, R. A. Bacteriophages. In: STATPEARLS. Treasure Island (FL). StatPearls, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>>. Acesso em: 12 de abr. 2018.

KAYE, K. S.; GALES, A. C.; DUBOURG, G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 542-548, 2017.

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

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

KONIG, C. et al. Multilocus sequence typing of *Corynebacterium ulcerans* provides evidence for zoonotic transmission for increased prevalence of certain sequence types among toxigenic strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4318-4324, 2014.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Towards a genome-based taxonomy of prokaryotes. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 18, p. 6258-6264, 2005.

KORSAK, D.; KRAWCZYK-BALSKA, A. Identification of molecular mechanism of trimethoprim resistance in *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 14, n. 12, p. 696-700, 2017.

LAGESEN, K. et al. RNAmmer: consistent annotation of rRNA genes in genomic sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 9, p. 3100-3108, 2007.

LAVOLLAY, M. et al. The β -lactam-sensitive D,D-carboxypeptidase activity of Pbp4 controls the L,D and D,D transpeptidation pathways in *Corynebacterium jeikeium*. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 650-661, 2009.

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

LEE, I. et al. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2053-2057, 2017.

LEE, Y. et al. Prediction of putative resistance islands in a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 2 clinical isolate. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 4, p. 320-324, 2016.

LEON, L. M.; MENDOZA, S. D.; BONDY-DENOMY, J. How bacteria control the CRISPR-Cas arsenal. **Current Opinion in Microbiology**, v. 42, p. 87-95, 2018.

LEONARD, R. B. et al. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 164-169, 1994.

LEPLAE, R.; LIMA-MENDEZ, G.; TOUSSAINT, A. ACLAME: a CLAssification of Mobile genetic elements, update 2010. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. D57-61, 2010.

LEVASSEUR, A. MIMIVIRE is a defence system in mimivirus that confers resistance to virophage. **Nature**, v. 532, p. 246-252, 2016.

LEVY, C.; MINNIS, D.; DERRICK, J. P. Dihydropteroate synthase from *Streptococcus pneumoniae*: structure, ligand recognition and mechanism of sulfonamide resistance. **The Biochemical Journal**, v. 412, n. 2, p. 379-388, 2008.

LI, Y. et al. Microbial pathogenicity and virulence mediated by integrons on Gram-positive microorganisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 481-486, 2017.

LIU, B.; POP, M. ARDB – Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D443-7, 2009.

LU, B.; LEONG, H. W. Computational methods for predicting genomic islands in microbial genomes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 200-206, 2016.

LUX, M. et al. ACDC – Automated Contamination Detection and Confidence Estimation for single-cell genome data. **BMC Informatics**, v. 17, n. 543, 2016.

MAGALHÃES, V. D.; et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

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.

MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 725-773, 1998.

MAIDEN, M. C. J. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MAKAROVA, K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722-736, 2015.

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**, v. 104, n. 6, p. 905-913, 2009.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. et al. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical sample. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2458-2461, 1995.

MARULL, J.; CASARES, P. A. Nosocomial valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*. **Cases Journal**, v. 1, p. 388, 2008.

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**, v. 52, n. 5, p. e139-141, 2006.

MASUDA, H. et al. A life-threatening infection due to *Corynebacterium striatum*: a lesson learned. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 26, n. 4, p. 709-10, 2017.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA JR, R.; DAMASCO, P. V. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos sobre o cenário atual. **Revista da Associação Brasileira de Imunologia**, v. 1, p. 1-19, 2011.

MCELVANIA TEKIPPE, E. et al. Rapid emergence of daptomycin resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum*, a cautionary tale. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 33, n. 12, p. 2199-2205, 2014.

MEIER-KOLTHOFF, J. P. et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 60, 2013.

MICHALEK, K. et al. The use of trimethoprim and sulfamethoxazole (TMP_SMX) in dermatology. **Folia Medica Cracoviensia**, v. LV, n. 1, p. 35-41, 2015.

MINA, N. V. et al. Canada's first case of multidrug-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain, isolated from a skin abscess. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 4003-5; 2011.

MIZOGUCHI H. et al. Quadricuspid aortic valve complicated with infective endocarditis: report of a case. **Surgery Today**, v. 44, n. 12, p. 2388-91, 2014.

MOLLMANN, S. et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium imitans* DSM 44264, isolated from a five-month-old boy with suspected pharyngeal diphtheria. **Genome Announcements**, v. 2, n. 6, 2014.

MOURA, A. et al. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. **Bioinformartics**, v. 25, n. 8, p. 1096-8, 2009.

NANDI, S. et al. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 7118-7122, 2004.

NAVAS, J. et al. Susceptibility to aminoglycosides and distribution of *aph* and *aac(3)-XI* genes among *Corynebacterium striatum* clinical isolates. **PLoS One**, v. 11, 2016.

NEEMUCHWALA, A. et al. *In vitro* antibiotic susceptibility pattern of Non-*diphtheriae* *Corynebacterium*. **Antimicrobial Agents of Chemoterapy**, v. 62, n. e01776-17, 2018.

NESMELOVA, I. V.; HACKETT, P. B. DDE transposases: structural similarity and diversity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 12, p. 1187-1195, 2010.

NESVERA, J.; HOCHMMANOVA, J.; PATEK, M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 15, n. 169, p. 391-395, 1998.

NGUYEN, C. T.; SAH, S. K.; KIM, T. Y. Inhibitory effects of superoxide dismutase 3 on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

NGUYEN, F. et al. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 559-575, 2014.

NHAN, T. X. et al. Microbiological investigation and clinical significance of *Corynebacterium* spp. in respiratory specimens. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 74, n. 3, p. 236-241, 2012.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.

NUCKEN, E. J.; HENSCHKE, R. B.; SCHMIDIT, F. R. Nucleotide-sequence of insertion element IS15 delta IV from plasmid pBP11. **DNA Sequence**, v. 1, n. 1, p. 85-88, 1990.

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

OLENDER, A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Corynebacterium* spp. causing infections in people. In: PANA, M. (Ed.) **Antibiotic resistant bacteria: a continuous challenge in the new millennium**. London: InTech, 2012. p. 387-402. 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. 2015.

OLENDER, A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. **Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 294-306, 2013.

OLIVEIRA, A. et al. Insight of genus *Corynebacterium*: ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1937, 2017.

OLIVEIRA, A. C. et al. Healthcare-associated infection: challenges in its prevention and control. **Revista Mineira de Enfermagem**, 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 maio 2012.

ORTIZ-PEREZ, A. et al. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 4, p. 273-277, 2010.

OSTRIA-HERNÁNDEZ, M. L. et al. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 332, 2015.

OTSUKA, Y. et al. *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3713-3717, 2005.

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, n. 2, p. 109-114, 2006.

PACHECO, L. G. C. et al, 2015. Draft genome sequences of two species of “difficult-to-identify” human –pathogenic *Corynebacteria*: implications for better identification tests. **Journal of Genomics**, v. 3, p. 82-84, 2015.

PAWLOWSKI, A. et al. The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. **Nature Communications**, v. 9, n. 112, 2018.

PARISE, D. **Genômica comparativa entre os biovares Equi e Ovis de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolados no México**. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Bioinformática) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2016.

PARTE, A. C. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 1825-1829, 2018.

PEIXOTO, R. S. et al. Invasion of endotelial cells and arthritogenic potential of endocarditis associated – *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 537-546, 2013.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PERRIN, A. et al. Comparative genomics identifies the genetic islands that distinguish *Neisseria meningitidis*, the agent of cerebrospinal meningitis, from other *Neisseria* species. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7063-7072, 2002.

PERSICKE, M. et al. Genome sequence of the soil bacterium *Corynebacterium callunae* DSM 20147. **Standards in Genomic Sciences**, v. 10, n. 5, 2015.

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**, v. 19, n. 5, p. 897–900, 1994.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers Microbiology**, v. 5, n. 65, 2011.

QIN, L. et al. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures from hospitalized patients in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 70, n. 2, p. 152-157, 2017.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Update**, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2010.

RAMÍREZ-BAHENA; M. H.; NESME, X.; MULLER, D. Rapid and simultaneous detection of linear chromosome and large plasmids in Proteobacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 736-739, 2012.

RAMOS, J. N. **Caracterização de estirpes sugestivas de corinebactérias isoladas de sítios intravenosos**. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

RATH, D. et al. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, v. 117, p. 119-128, 2015.

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

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

RENOM, F. et al. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. **New Microbes and New Infections**, v. 2, n. 4, p. 106-14, 2014.

RHODES, D. M. et al. Minimum inhibitory concentrations of equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates (1996-2012). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 327-332, 2015.

RICKER, N.; QIAN, H.; FULTHORPE, R. R. The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution. **Genomics**, v. 100, p. 167-175, 2012.

ROBERTS, M. C. et al. Characterization of antibiotic-resistant *Corynebacterium striatum* strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 463-474, 1992.

ROLSTON, K. V. et al. Spectrum of gram-positive bacteraemia and in vitro activities of daptomycin, linezolid and vancomycin against organisms isolated from cancer patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 6, p. 516-520, 2013.

ROLSTON, K. V. et al. In vitro activity of telavancin compared with vancomycin and linezolid against Gram-positive organisms isolated from cancer patients. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 7, p. 505-509, 2014.

ROSATO, A. E., LEE, B. S., NASH, K. A. Inducible macrolide resistance in *Corynebacterium jeikeium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1982-1989, 2001.

ROWE-MAGNUS, D. A., MAZEL, D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 565-569, 2001.

ROY, M.; AHMAD, S. Rare case of *Corynebacterium striatum* septic arthritis. **BMJ Case Reports**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664229>>. Acesso em: 15 out. 2017.

RUIZ, J. C. et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PLoS One**, v. 6, n. 4, 2011.

SADER, H. S. et al. Daptomycin activity against uncommonly isolated streptococcal and other Gram-Positive species groups. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 6378-6380, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SALEM, N. et al. *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 129-145, 2015.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347-355, 2014.

SANDGREN, A. et al. Tuberculosis drug resistance mutation database. **PlosOne Medicine**, v. 6, n. 2, 2009.

SANGAL, V.; FINERAN, P. C.; HOSKISSON, P. A. Novel configurations of type I and II CRISPR-Cas systems in *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 159, n. 10, p. 2118-2126, 2013.

SANGAL, V.; HOSKISSON, P. A. Corynephages: Infections of the Infectors. In: BURKOVISK, A. *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species – **Genomics, Pathogenicity and Applications**. Netherlands: Springer, 2014. p. 67-81.

SAVINI, V. et al. About a bloodstream *Corynebacterium striatum* isolate. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 6, p. 451-3, 2013.

SCHOEN, C. et al. Life-threatening infection caused by daptomycin-resistant *Corynebacterium jeikeium* in a neutropenic patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2328-2331, 2009.

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**, v. 13, n. 141, 2012.

SCHWARZ, S. et al. Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: mode of action and mechanisms of resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 027037, 2016.

SEDAGHAT, H. et al. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in Isfahan, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 9, n. 5, p.264-270, 2017.

SEED, K. D. et al. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptative response to evade host innate immunity. **Nature**, v. 494, n. 7438, p. 489-491, 2013.

SEVERO, C. B. et al. Multiple pulmonary nodules caused by *Corynebacterium striatum* in an immunocompetent patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 89-91, 2014.

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**, v. 33, n. 3, p. 759-761, 1995.

SHAH, M.; MURILLO, J. L. Successful treatment of *Corynebacterium striatum* endocarditis with daptomycin plus rifampin. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 39, n. 10, p. 1741-1744, 2005.

SHEEHAN, L. M. et al. A LysR-family transcriptional regulator required for virulence in *Brucella abortus* is highly conserved among the α -proteobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 318-328, 2015.

SHEIKH, A. F. et al. Detection of metallo-beta lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v 7, n. 11, p. e12289, 2014.

SHEN, T. et al. Determination of nucleotide sequence of *Corynebacterium* plasmid pXZ10145. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 171-8, 1993.

SHI, K. et al. Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 22, 2013.

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

SIGUIER, P. et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D32-D36, 2006.

SILVA, V. D.; MELLO, F. C. Q.; FIGUEIREDO, S. C. A. Estimated rates of recurrence, cure, and treatment abandonment in patients with pulmonary tuberculosis treated with a four-drug fixed-dose combination regimen at a tertiary health care facility in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 2, p. 113-120, 2017.

SIMPSON, A. J. G.; PARRA, J. C.; PEREZ, J. F. Projetos Genoma no Brasil. Revolução na Biotecnologia Brasileira. In: **Genômica**. São Paulo: Editoria Atheneu, 2004, p. 1091-1096.

SIMPSON-LOUREDO, L. et al. *Corynebacterium ulcerans* isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 2, p. 343-352, 2014.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SOARES, S. C. et al. PIPS: Pathogenicity Island Prediction Software. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2012.

SOARES, S. C. et al. The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar *ovis* and *equi* strains. **PLos One**, v. 8, n. 2, 2013.

SOARES, S. C. et al. GIPSy: Genomic Island Prediction Software. **Journal of Biotechnology**, v. 232, p. 2-11, 2016.

SPIZEK, J.; REZANKA, T. Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 20-28, 2017.

STAATS, C. C.; MORAIS, G. L., MARGIS, R. Projetos Genoma. In: VERLI, H. (org). **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. p. 63-66.

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

STOKES, W. W.; HALL, R. M. A novel-family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1669-1683, 1989.

SULLIVAN, M. J.; PETTY, N. K.; BEATSON, S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1009-1010, 2011.

SUZUKI, Y. et al. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identifying mutations in 16S rRNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1220-1225, 1998.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolutionary**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TANAKA, Y. et al. Different rifampicin inactivation mechanisms in *Nocardia* and related taxa. **Microbiology and Immunology**, v. 40, n. 1, p. 1-4, 1996.

TAKAHASHI, Y., NAKASHIMA, T. Actinomycetes, na inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 45, 2018.

TARR, P. E. et al. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. **Transplants Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 53-58, 2003.

TAUCH, A. et al. The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated *IS1249*, flanking the erythromycin resistance gene *ermCX*. **Plasmid**, v. 34, p. 119-131, 1995.

TAUCH, A. et al. *Corynebacterium striatum* chloramphenicol resistance transposon Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. **Plasmid**, v. 40, n. 2, p. 126-139, 1998.

TAUCH, A. et al. The *tetAB* genes of the *Corynebacterium striatum* R-plasmid pTP10 encode an ABC transporter and confer tetracycline, oxytetracycline and oxacillin resistance in *Corynebacterium glutamicum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, n. 173, p. 203-209, 1999.

TAUCH, A. et al. The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. **Molecular and General Genetics**, v. 263, n. 1, p. 1-11, 2000.

TAUCH, A. et al. The 27,8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system TET33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS 6100. **Plasmid**, v. 48, n. 2, p. 117-129, 2002.

TAUCH, A. et al. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4671-82, 2005.

TAUCH, A. et al. The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. **J Biotechnol**, v. 136, n. 1-2, p. 11-21, 2008.

TAYLOR, S. D.; PALMER, M. The action mechanism of daptomycin. **Bioorganic and Medicine Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6253-6268, 2016.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 419-31, 2010.

THOMPSON, C. C. et al. Microbial genomic taxonomy. **Genomics**, v. 14, n. 913, 2013.

THOMPSON, F. L.; OLIVEIRA, V. M. **Taxonomia de procariontes**. In: Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus. 50 p. 2006. Disponível

em: <<http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249-66, 2010.

TIPPELT, A. et al. Complete sequence of *Corynebacterium ureicelerivorans* DSM 45051, a lipoholic and urea-splitting isolate from the blood culture of a septicemia patient. **Genome Announcements**, v. 2, n. 6, p. e01211-14, 2014.

TORRES, L. F. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 272-279, 2013.

TRAN, T. T. Native valve endocarditis caused by *Corynebacterium striatum* high-level daptomycin resistance: collateral damage from daptomycin therapy? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3461-3464, 2012.

TRENT, J. O.; van der DONK, W. Follow the leader: The use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 2010.

TRIBUDDHARAT, C.; FENNEWALD, M. Integron-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 960-962, 1999.

TROST, E. et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis and pneumonia. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3199-3215, 2012.

TSAFNAT, G., COPTY, J., PARTRIDGE, S. R. RAC: Repository of Antibiotic resistance Cassettes. **Database**, Oxford, 2011.

TSUGE, Y. et al. A new insertion sequence, IS14999, from *Corynebacterium glutamicum*. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 2, p. 501-508, 2005.

TURNER, K. M. E.; FEIL, E. J. The secret life of the Multilocus sequence type. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 2, p. 129-135, 2007.

UBALDI, M. et al. Coryneform bacteria: their clinical significance and resistance patterns during a three-year study. **Le Infezione in Medicina**, v. 12, n. 2, p. 126-131, 2004.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

VALBUENA, N. et al. Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 643-657, 2007.

VALDERAS, M. W. et al. Examination of intrinsic sulfonamide resistance in *Bacillus anthracis*: a novel assay for dihydropteroate synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 5, p. 848-853, 2008.

VANDERCRAEN, J. et al. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 709-730, 2017.

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

VETTING, M. W. et al. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, n. 1, p. 212-226, 2005.

VIANA, M. V. C. et al. Comparative genomic analysis between *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from buffalo. **PLoS One**, v. 12, n. 4, 2017.

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

WANG, J. et al. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China. **Journal of Infection in Development Countries**, v. 10, n. 12, p. 1299-1305, 2016.

WATKINS, R. R., BONOMO, R. A. Overview: Global and local impact of antibiotic resistance. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 313-322, 2016.

WERTH, B. J. et al. Emergence of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum* in two patients with left ventricular assist device infections. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 3, p. 233–237, 2016.

WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, p. 331-338, 2012.

WILEN, M. et al. Cotrimoxazole resistance of *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci from Kampala, Uganda. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 2, p. 113-121, 2009.

WITTEBOLE, X.; ROOCK, S.; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 226-235, 2014.

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

WU, S. et al. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 47, 2010.

WU, XQ. et al. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using four molecular methods in China. **Acta Genetica Sinica**, v. 33, n. 7, p. 663-665, 2006.

XU, J. et al. The left atrial bacterial vegetative mass due to *Corynebacterium striatum* as a presentation of myxoma: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 368, 2017.

YAMAMOTO, T. et al. An extremely rare case of tubo-ovarian abscesses involving *Corynebacterium striatum* as causative agent. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 527, 2016.

YANAI, M. et al. Restropective evaluation of the clinical characteristics associated with *Corynebacterium* species bacteremia. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 24-29, 2018

YOON, S. et al. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 47-48, 2011.

YOON, S. H. et al. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 10, p. 1281-1286, 2017.

YUN, M. K. et al. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. **Science**, v. 335, n. 6072, 2012.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.

ZHANG, R.; ZHANG, C. T. Genomics islands in the *Corynebacterium efficiens* genome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3126-3130, 2005.

ZHOU, Y. et al. PHAST: a fast phage search tool. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 2, suppl, p. W347-W352, 2011.

APÊNDICE - MANUSCRITOS PRODUZIDOS NESTE TRABALHO COMO PRIMEIRA AUTORA

- Aceito para publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz:

“Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil”

- Submetido à revista “BMC Infectious Diseases”:

“Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*”

- Em fase de submissão:

“Novel mutations in the QRDR region *gyrA* gene in multidrug-resistance *Corynebacterium* spp. isolates from intravenous sites”

ANEXO A - RESULTADOS DO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS 21 ESTIRPES DE *C. STRIATUM* (RAMOS, 2014)

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das 21 estirpes de *C. striatum* pelos métodos de disco-difusão (halos em milímetros) e difusão em gradiente de concentração (CIM em mg/L)

Estirpes	Antimicrobianos ¹												
	CIP	MOX	GEN	VAN	CLI	ERI	LIN	RIF	IMI	CLO	PEN	TET	PS ²
2023	0	12	10	20	0	0	39	0	0	0	>256	1	A
2038	0	14	0	21	0	0	33	0	0	0	>256	1	A
2089	0	13	10	24	0	0	46	0	0	13	>256	0,5	A
2091	0	13	8	18	0	0	34	0	0	6	>256	2	A
2103	0	14	15	20	0	0	32	0	0	0	2-3	1	A
2245	0	13	13	18	0	0	36	0	0	0	>256	2	A
2285	0	13	9	17	0	0	38	0	0	8	>256	2	A
2308	0	13	8	19	0	0	33	0	0	0	>256	1	A
2316	0	10	9	19	0	0	38	0	0	6	>256	2	A
2439	0	13	11	17	0	0	39	0	0	8	>256	1	A
2454	0	12	9	19	0	0	36	0	0	9	>256	1	A
2228	0	13	9	20	0	0	38	38	0	7	4	1	B
2230	0	13	0	20	0	0	33	39	0	0	2-4	2	B
2237	0	14	0	20	0	0	35	39	0	0	2-4	1	B
2243	0	11	11	20	0	0	41	42	0	9	>256	0,5	B
2324	0	0	10	22	0	0	38	38	4	0	2	0,5	B
2390	0	15	10	20	0	0	39	0	32	0	1	1	B1
2296	0	8	6	20	0	0	35	39	33	0	0,5	0,5	C
2401	0	0	0	22	0	0	36	35	30	0	2	1	C
2432	0	0	19	22	0	0	38	43	36	9	0,25	0,25	C
2130	22	20	28	29	0	0	33	42	35	6	0,5	2	D
2425	0	0	28	22	0	0	32	40	32	10	0,12	0,5	E
2376	32	32	28	20	23	25	36	39	33	26	0,5	2	F

Os resultados destacados em amarelo e verde significam fenótipos resistentes e sensíveis, respectivamente. CIM = Concentração inibitória mínima; ¹ CLI: clindamicina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; IMI: imipenem; LIN: linezolida; MOX: moxifloxacino; PEN: penicilina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina; ² PS: perfil de susceptibilidade. Os antimicrobianos penicilina e tetraciclina foram os únicos testados pelo método de difusão em gradiente de concentração, os demais foram testados pelo método de disco-difusão e os valores dos halos em milímetros são mostrados na tabela para cada antimicrobiano

A definição de resistência em *C. striatum* baseou-se nos pontos de corte para CIM e diâmetros dos halos (em milímetros) definidos pelo documento BrCAST (2017). Devido à ausência de pontos de corte para os antimicrobianos linezolida (30 µg), imipenem (10 µg) e cloranfenicol (30 µg) para *Corynebacterium* spp., foram utilizados os pontos de corte para *Staphylococcus* spp.

Vinte isolados apresentaram cinco níveis diferentes de multirresistência correspondendo a seis perfis de susceptibilidade: A, com resistência a 9 agentes antimicrobianos; B e B1, resistência a 8 agentes antimicrobianos; C, resistência a 7 agentes antimicrobianos; D, resistência a 6 agentes antimicrobianos e E, com 5 agentes

antimicrobianos. Exceto a estirpe 2376 isolada de neonato, todos as estirpes de *C. striatum* foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano em três ou mais categorias e consequentemente identificados como multirresistentes.

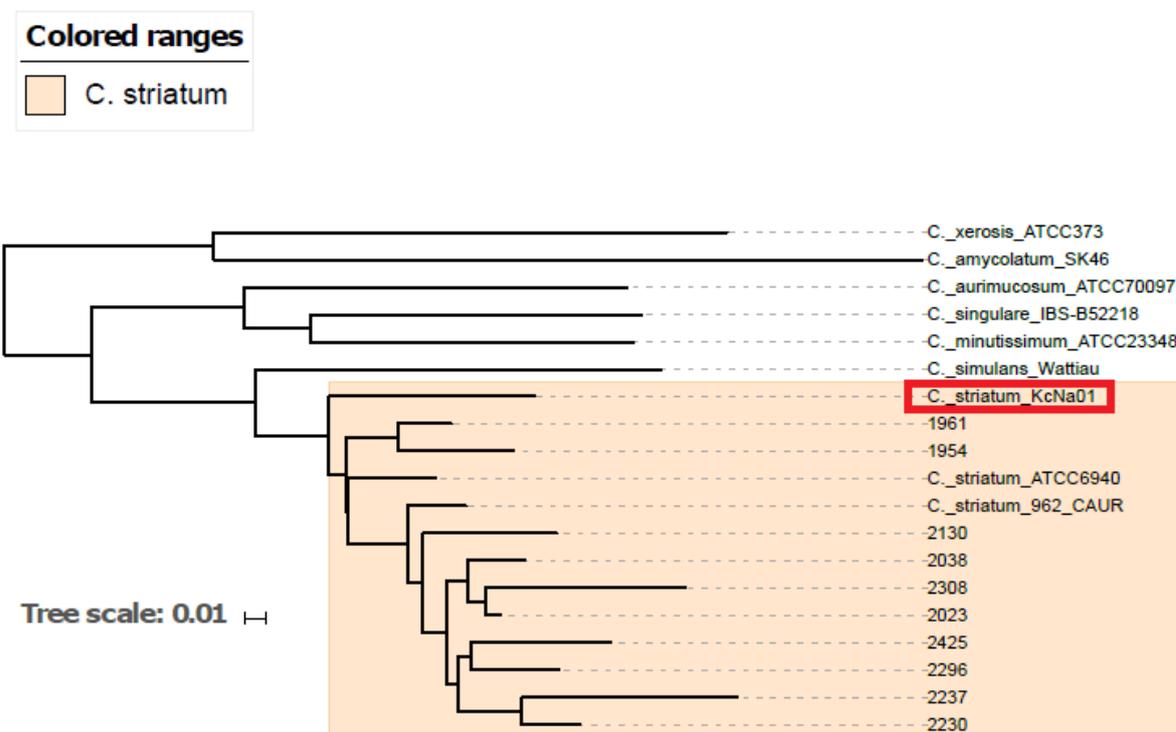
ANEXO B - RESULTADOS DAS ABORDAGENS TAXONÔMICAS APLICADAS À ESTIRPE *C. STRIATUM* KC-NA-01 (GENBANK Nº CP021252)

Resultados das análises de taxonômica genômica da estirpe Kc-Na-01 utilizando a cepa tipo ATCC 6940 como referência para as abordagens empregadas.

Estirpes	ANI (%) (>95%)	AAI (%) (>95%)	DDH (%) (>70%)	Assinatura de Karlin (< 10)
Kc-Na-01	95,1	94,7	62,2	5,9

ANI, identidade média de nucleotídeos; AAI, identidade média de aminoácidos; DDH, hibridização DNA-DNA *in silico*.

Árvore-guia gerada pelo alinhamento entre os genomas que compartilham o maior conteúdo genético, gerada pelo programa *Mauve*.



A barra de escala (0,01) representa a taxa de substituições nucleotídicas por sítio.