

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde



PMBqBM
Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

Carolina Silva Santos

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE
CORINEBACTÉRIAS PATOGÊNICAS EMERGENTES
COM IMPLICAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE
TESTES DIAGNÓSTICOS MELHORADOS**

Salvador
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR (PMBqBM)

CAROLINA SILVA SANTOS

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE CORINEBACTÉRIAS PATOGÊNICAS
EMERGENTES COM IMPLICAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE TESTES
DIAGNÓSTICOS MELHORADOS**

SALVADOR

2016

CAROLINA SILVA SANTOS

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE CORINEBACTÉRIAS PATOGÊNICAS
EMERGENTES COM IMPLICAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE TESTES
DIAGNÓSTICOS MELHORADOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Luis Gustavo Carvalho Pacheco (UFBA)

Co-orientadora: Dr^a Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

SALVADOR

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Maria Giovane e Renovato, e aos meus irmãos Pedro Henrique e Marcus Vinícius. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia pelas oportunidades conferidas a mim durante os anos de graduação e, agora, de pós-graduação;

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e às coordenadoras locais, Professoras Doutoras Luzimar Gonzaga e Aline Miranda pela oportunidade de cursar o mestrado na área que escolhi, apesar das dificuldades encontradas; a todos os colegas e amigos que fiz no mestrado, em especial Thamires Silva;

À Professora Doutora Neuza Alcântara e aos colegas do Laboratório de Alergia e Acarologia pela concessão do espaço físico e companheirismo na execução deste trabalho;

Ao Laboratório de Imunologia e a Rogério Reis pela prestatividade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto (Edital JCB0031/2013);

Ao meu orientador, Professor Doutor Luis Pacheco, pelos puxões de orelha e por acreditar em mim. Gravei cada palavra em minha vida e volto sempre a elas ao lembrar que preciso ser uma pessoa e profissional ainda melhor. Muito obrigada.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Liza Figueiredo Felicori Vilela, pelas contribuições neste trabalho e por ter aceitado o convite para compor a banca de avaliação final;

Às Professoras Doutoras Aline Miranda e Suzana Telles da Cunha Lima, por aceitarem o convite para compor a banca de qualificação. Obrigada pelas excelentes contribuições;

Ao Dr. Leonardo Paiva Farias por também ter aceitado o convite para compor a banca de avaliação final;

Ao Grupo de Estudos em Genômica Funcional e Biologia Sintética (GenoFun), grupo de pesquisa coordenado pelo Professor Doutor Luis Pacheco e no qual estou inserida, aos meus colegas do Grupo e, em especial, a Danilo Jobim, pelo apoio e companheirismo;

Às Professoras Doutoras Ana Guaraldi e Verônica Vieira e a M.a Juliana Ramos e ao Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica pela disponibilização de amostras e por sempre serem solícitas;

Aos Professores Doutores Rommel Ramos e Artur Silva e ao Laboratório de Polimorfismos de DNA (UFPA) pela contribuição no sequenciamento das linhagens e montagem dos genomas;

Ao Professor Doutor Vasco Azevedo, ao Doutor Luis Guimarães, e ao Laboratório de Genética Celular e Molecular (UFMG) por toda a contribuição;

Aos amigos Karen Sadoyama, Diogo Portella e Aline Silva, pelas palavras de incentivo e pelo apoio prestado;

À SGI e ao senhor Daisaku Ikeda, por me ajudarem a compreender o meu verdadeiro potencial.

*“Por exigir um trabalho árduo, também
produz imensa alegria em nossa vida.”*

Daisaku Ikeda

RESUMO

Corinebactérias não diftéricas têm sido reconhecidas como agentes causadores de infecções oportunistas e nosocomiais em seres humanos. A identificação destas bactérias pelos testes mais comumente utilizados, baseados em baterias de 20 reações bioquímicas, é considerada desafiadora e normalmente requer a utilização de métodos adicionais, incluindo o sequenciamento do gene *16S rRNA* e análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Em particular, as espécies frequentemente reportadas *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. xerosis* e *C. minutissimum* normalmente geram perfis bioquímicos que podem levar a identificações ambíguas ou mesmo completamente equivocadas nos laboratórios de microbiologia clínica. Para algumas destas espécies, o sequenciamento parcial ou total de um gene de referência adicional, *rpoB*, pode ser necessário para alcançar identificações não ambíguas e mesmo esta estratégia pode falhar. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi utilizar a genômica comparativa para identificação de novos alvos que possam contribuir para identificação rápida e confiável destas corinebactérias. Sequências genômicas completas de três isolados, *C. minutissimum* 1941, *C. striatum* 1961, e *C. xerosis* ATCC 373^T, foram geradas pelo nosso grupo. Nós utilizamos o servidor RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) para anotar automaticamente estes genomas e a análise genômica comparativa foi realizada através do EDGAR (*Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios*). O genoma publicamente disponível da linhagem SK46 de *C. amycolatum* também foi incluído nestas análises. A anotação genômica automatizada permitiu a identificação de um número médio de 2.539 sequências codificadoras por genoma e foi possível identificar um número de genes distintos para cada espécie. Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para detecção de genes espécie-específicos para o desenvolvimento de novos métodos de identificação molecular que foram capazes de identificar de forma não ambígua um pequeno painel de linhagens de *C. xerosis*, *C. striatum* e *C. amycolatum*. Os resultados destes novos testes obtiveram 100% de concordância com as identificações obtidas pelo sequenciamento dos genes *16S rRNA* e *rpoB* dos isolados bacterianos estudados.

Patógenos emergentes, Genômica comparativa, Identificação bacteriana.

ABSTRACT

Non-diphtheriae *Corynebacterium* species have been recognized as the causative agents of opportunistic and nosocomial infections in humans. The identification of these emerging pathogenic *Corynebacteria* by the most commonly used tests, based on batteries of twenty biochemical reactions, is considered as challenging, and normally requires additional methods including 16S *rRNA* gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. In particular, the frequently reported species *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. xerosis* and *C. minutissimum* normally generate biochemical profiles that may lead to ambiguous and even erroneous identifications in the clinical microbiology laboratory. For some of these species, partial or full sequencing of an additional reference gene, *rpoB*, may be necessary to achieve unambiguous identifications and even this method can fail. In this context, the aim of this study is to use comparative genomics to identify novel genes that might contribute to rapid and reliable identification of these emerging human-pathogenic corynebacteria. Whole genome sequences of three corynebacterial isolates, namely *C. minutissimum* 1941, *C. striatum* 1961, and *C. xerosis* ATCC 373T, were generated by our group. We used RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) for automatically annotate these newly generated genome sequences and comparative genome analysis was performed with EDGAR (Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios). We also included in these comparisons the publicly available genome sequence of the strain SK46 of *C. amycolatum*. Automated genome annotation allowed the identification of a mean number of 2,539 protein encoding genes per genome, and it was possible to detect a number of distinctive genes for each species. Oligonucleotide primers were designed to target species-specific genes, aiming the development of novel molecular identification methods that have already contributed to the unambiguous identification of *C. xerosis*, *C. striatum* and *C. amycolatum*. Noteworthy, results of these novel molecular identification tests were 100% in agreement with identifications obtained by 16S *rRNA* and *rpoB* gene sequencing of the bacterial isolates studied.

Emerging pathogens, Comparative Genomics, Bacterial identification

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 – Fluxograma geral da metodologia utilizada neste trabalho.....	37
Figura 2 - Diagrama de Venn gerado a partir da análise genômica comparativa baseada em scores de BLAST e feita através do servidor EDGAR..	52
Figura 3 - Análise genômica comparativa para seleção de gene marcador para o gênero <i>Corynebacterium spp.</i>	53
Figura 4 - Alinhamentos realizados para desenho de primers para marcação de gênero.	54
Figura 5 - Tentativa de padronização da reação de PCR para alvo marcador de gênero.	54
Figura 6 - Tentativa de padronização da reação de PCR para alvos espécie-específicos.....	55
Figura 7 - Tentativa de padronização da reação de PCR utilizando Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (1)..	56
Figura 8 – Distribuição do genoma de <i>C. xerosis</i> 373 ^T em categorias funcionais.	58
Figura 9 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de <i>C. xerosis</i>	59
Figura 10 - Resultado do teste de especificidade analítica para <i>primers</i> de <i>C. xerosis</i>	60
Figura 11 Distribuição do genoma de <i>C. striatum</i> 1961 BR-RJ/09 em categorias funcionais.	61
Figura 12 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de <i>C. striatum</i>	62
Figura 13 – Alinhamentos realizados para desenho de <i>primers</i> de <i>C. striatum</i> ..	62
Figura 14 - Teste de especificidade analítica do ensaio de PCR para <i>C. striatum</i>	63
Figura 15 – Testes de reprodutibilidade de amplificação dos alvos de <i>C. striatum</i>	64
Figura 16 – Teste de especificidade analítica dos <i>primers</i> de <i>C. striatum</i> com amostras de <i>C. amycolatum</i>	64

Figura 17 - Distribuição do genoma de <i>C. minutissimum</i> 1941 em categorias funcionais.	68
Figura 18 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de <i>C. minutissimum</i>	69
Figura 19 - Distribuição do genoma de <i>C. amycolatum</i> SK46 em categorias funcionais..	71
Figura 20 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de <i>C. amycolatum</i>	72
Figura 21 – Avaliação do desempenho de diferentes pares de <i>primers</i> para amplificação do alvo de <i>C. amycolatum</i>	73
Figura 22 – Testes de especificidade analítica do ensaio de PCR para <i>C. amycolatum</i>	74
Figura 23 – Testes de especificidade analítica dos <i>primers</i> de <i>C. amycolatum</i> com amostras de <i>C. striatum</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens das técnicas de identificação de corinebactérias mais utilizadas	26
Tabela 2 - Caracterização bioquímica e genotípica das linhagens utilizadas como referência nos testes moleculares.....	39
Tabela 3 – Caracterização bioquímica e genotípica das demais linhagens utilizadas para avaliação dos testes moleculares.....	39
Tabela 4 - Sistemas e condições de PCR utilizados	43
Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR	45
Tabela 6 - Informações genômicas de corinebactérias do complexo XSMA utilizadas neste estudo	49
Tabela 7 - Informações genômicas de outras corinebactérias do complexo XSMA disponíveis até o momento	50
Tabela 8 - Resultados de sequenciamento e anotação genômica.....	50
Tabela 9 – Comparação entre os testes de identificação bioquímicos e identificação por PCR para <i>C. striatum</i>	65
Tabela 10 – Valores de sensibilidade e especificidade analítica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação bioquímicos para <i>C. striatum</i>	66
Tabela 11 - Comparação entre os testes de identificação genotípicos e identificação por PCR para <i>C. striatum</i>	66
Tabela 12 - Valores de sensibilidade e especificidade analítica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação genotípicos para <i>C. striatum</i>	67
Tabela 13 - Comparação entre os testes de identificação bioquímicos e identificação por PCR para <i>C. amycolatum</i>	75
Tabela 14 - Valores de sensibilidade e especificidade analítica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação bioquímicos para <i>C. amycolatum</i>	76
Tabela 15 - Comparação entre os testes de identificação genotípicos e identificação por PCR para <i>C. amycolatum</i>	77
Tabela 16 - Valores de sensibilidade e especificidade analítica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação bioquímicos para <i>C. amycolatum</i>	78
Tabela 17 - Ensaios de PCR realizados	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

16s rRNA	Gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossômico
\geq	Maior ou igual a
\leq	Menor ou igual a
=	Igual a
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTn	BLAST de nucleotídeos
BLASTx	BLAST de proteínas traduzidas
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CDSs	<i>Coding Sequences</i> (Sequências codificadoras)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
dATP	Desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	Desoxicitidina trifosfatada
dGTP	Desoxiguanosina trifosfatada
dTTP	Desoxitimidina trifosfatada
EDGAR	<i>Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nr	Não redundante
NR	Não realizado
Pb	Pares de base

RAST	<i>Rapid Annotations using Subsystems Technology</i>
<i>rpoB</i>	Gene codificador da subunidade beta da enzima RNA Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SVRs	Score Value Ratios – Taxas de valores de <i>scores</i>
SEED	Ferramenta de anotação/análise de genomas
TOF	<i>Time of flight</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
1.1.1. Doenças infecciosas emergentes.....	22
1.1.2. Gênero <i>Corynebacterium spp.</i> , corinebactérias patogênicas e complexo XSMA.....	23
1.1.3. Identificação das espécies e papel no correto diagnóstico	25
1.1.4. Resistência múltipla a agentes antimicrobianos.....	32
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral.....	36
3.2. Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. Linhagens bacterianas.....	38
4.2. Sequenciamento genômico por métodos de nova geração e montagem dos genomas	40
4.3. Anotação genômica	41
4.4. Análise genômica comparativa e seleção de genes únicos.....	41
4.5. Desenho de <i>primers</i>	42
4.6. Reações de PCR	43
4.6.1. Eletroforese em gel de agarose	46
4.6.2. Testes de sensibilidade diagnóstica	46
4.6.3. Testes de especificidade analítica.....	47
4.6.4. Testes de especificidade diagnóstica.....	47
4.6.5. Estabelecimento de concordância diagnóstica	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Sequenciamento e anotação funcional dos genomas	48

5.2. Análise genômica comparativa	51
5.3. Ensaio de PCR	53
5.3.1. Padronização de PCR e resultados iniciais.....	53
5.3.2. Desenvolvimento de teste de identificação para <i>Corynebacterium xerosis</i>	57
5.3.3. Desenvolvimento de teste de identificação para <i>Corynebacterium striatum</i>	60
5.3.4. Desenvolvimento de teste de identificação para <i>Corynebacterium minutissimum</i>	68
5.3.5. Desenvolvimento de teste de identificação para <i>Corynebacterium amycolatum</i>	71
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO I – PRODUÇÃO GERADA	88
APÊNDICE I – SEQUÊNCIAS GÊNICAS UTILIZADAS PARA O DESENHO DE <i>PRIMERS</i>	92

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento no número de casos relacionados a infecções ocasionadas, especialmente, por bactérias patogênicas emergentes vem chamando a atenção da comunidade médica e científica para sua importância. Dados de 2012 revelam que, ao longo de 20 anos, 15 milhões de mortes ocorreram anualmente causadas por esses agentes, estando atrás apenas do número de mortes causadas por doenças de natureza cardiovascular (FAUCI e MORENS, 2012). A Organização Mundial de Saúde estima que, em 2030, 25 mil pessoas morrerão diariamente vítimas de doenças infecciosas (WHO, 2015).

Dentre as doenças infecciosas emergentes e reemergentes, a difteria merece destaque devido à periodicidade de surtos e ondas epidêmicas com alta incidência e altas taxas de mortalidade (GALASKA, 2000). Esta doença é ocasionada pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae*, principal representante e organismo mais estudado do gênero *Corynebacterium spp*, que é composto por diversas espécies de interesse médico ou veterinário, algumas capazes de produzir toxina diftérica e outras não produtoras dessa toxina conhecidas como corinebactérias não diftéricas, ou ainda como difteróides (KONRAD; HÖRMANSDORFER; SING, 2015).

As corinebactérias não-diftéricas podem ser encontradas naturalmente na mucosa e na microbiota normal da pele de humanos e animais. Na atualidade, estas espécies têm sido encontradas com frequência em materiais clínicos, sendo difícil determinar em tempo hábil se sua presença implica em simples contaminação ou se é clinicamente relevante (BERNARD, 2012).

No entanto, as corinebactérias vêm sendo relatadas na literatura como agentes patogênicos oportunistas e causadores de infecções nosocomiais em humanos estando associadas a septicemias, endocardite, infecções de feridas cirúrgicas, de próteses e infecções relacionadas a cateteres. Estas infecções deixaram de ser raras devido ao dramático aumento no número de pessoas susceptíveis, incluindo aqueles que recebem terapia imunossupressora para tratamento de câncer, os com doenças autoimunes e pacientes transplantados (VILA et al, 2012). Estudos de 2015 apontaram bactérias do gênero *Corynebacterium spp*. como segunda causa mais comum de infecção em ferimentos crônicos em um estudo realizado nos Estados Unidos da América, sendo *C. striatum* e *C. xerosis* duas das três espécies de

corinebactérias isoladas mais frequentes (WOLCOTT et al, 2015). No Brasil, estas bactérias foram relatadas como uma das principais causadoras de infecções em pacientes com câncer em um hospital na cidade do Rio de Janeiro (MARTINS et al, 2009).

Um outro estudo observou a rápida aquisição de resistência à daptomicina em linhagens de *C. striatum* avaliadas *in vivo* e *in vitro*. Este antibiótico é geralmente utilizado como última escolha em infecções ocasionadas por bactérias gram positivas resistentes e o mecanismo de desenvolvimento desta resistência ainda não está claro. (TEKIPPE et al, 2014).

As atenções no campo de pesquisa e identificação bacteriana têm sido voltadas às corinebactérias não-diftéricas do aqui chamado complexo XSMA (*Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium amycolatum*) não só pelo seu potencial patogênico, mas também pelas dificuldades encontradas para identificar e diagnosticar de forma precisa a presença dessas espécies, devido a suas altas variabilidades bioquímicas entre linhagens da mesma espécie. Esta correta identificação a nível de espécie se faz necessária para identificar a origem de surtos, efetuar o registro de dados epidemiológicos e conduzir o tratamento do paciente com antibióticos adequados a cada espécie.

A correta identificação de corinebactérias constitui ainda hoje um sério problema para a conduta médica e a metodologia mais utilizada para diferenciação destas bactérias é o teste API Coryne™ (bioMérieux), um sistema padronizado para a identificação de bactérias corineformes que utiliza 20 testes bioquímicos miniaturizados para detecção de atividades enzimáticas e fermentação de carboidratos, além de uma base de dados on-line específica, gerando resultados após 24 horas (API Coryne™, Guia do Usuário. BioMérieux). Mesmo com ampla utilização, este teste frequentemente gera resultados ambíguos ou pouco confiáveis com várias possíveis espécies, visto que os painéis contêm número de substratos insuficientes para diferenciar entre as espécies relevantes e seu banco de dados não é atualizado com a frequência necessária, sendo necessário utilizar outras reações que não estão presentes no sistema e tornando sua utilização pouco eficiente (SUWANTARAT et al, 2016).

Para a identificação das bactérias do grupo XSMA, em especial, o API Coryne™ tem demonstrado não ser um bom teste, mesmo na versão mais atual. A espécie *C. xerosis* foi retirada do banco de dados de identificação e, portanto, não pode ser identificada, enquanto que *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. amycolatum* só podem ser identificadas a nível de espécie com a utilização de testes adicionais, sendo que as identificações geradas ainda podem ser ambíguas entre *C. striatum*/*C. amycolatum* (API, The Reference).

Os métodos moleculares, como o sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S (*16S rRNA*) seguido do sequenciamento da subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) foram utilizados por muito tempo para diferenciação entre estas espécies e estabelecimento de relações taxonômicas (PASCUAL et al, 1995; KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2005) e ainda são os mais utilizados como testes complementares de identificação, mas também não são completamente eficientes para diferenciar as corinebactérias. A identificação em nível de espécie por sequenciamento do gene do *16S rRNA* é dada normalmente quando a sequência obtida para um isolado clínico apresenta similaridade > 97% com a de um microrganismo de referência. Contudo, em alguns casos, tais como entre as espécies *C. propinquum* e *C. pseudodiphtheriticum* e entre *C. xerosis*, *C. freneyi* e *C. hansenii*, a similaridade do gene do *16S rRNA* pode ser maior do que 98% e ainda assim não ser suficiente para diferenciação específica (BERNARD, 2012).

Recentemente, o uso de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e do sistema Vitek MS (bioMérieux), dentre outros sistemas, vem sendo cada vez mais aplicado na identificação bacteriana, especificamente por se tratarem de métodos muito rápidos e, apesar do custo alto de aquisição dos equipamentos, o valor de cada análise é relativamente baixo (ALIBI et al, 2015; BERNARD, 2012). Porém, os recentes estudos publicados sobre identificação de corinebactérias por espectrometria de massas ainda relatam identificações ambíguas e os diferentes sistemas têm limitações na variedade de espécies em seus bancos de dados, que também não são atualizados com a frequência adequada (SZEMRAJ et al, 2014; SCHULTHESS et al, 2014; BERNARD, 2012).

O método mais confiável de identificação atualmente baseia-se no sequenciamento do genoma total da espécie em estudo, que além de fornecer informações estruturais e permitir a comparação com outros genomas, permite a

identificação de genes espécie específicos, bem como o delineamento de perfis de resistência a antibióticos pela presença ou ausência de genes conhecidamente relacionados e o monitoramento de surtos em tempo real (KÖSER et al, 2012). No entanto, devido ao alto custo de aquisição dos equipamentos necessários e da necessidade de pessoal devidamente qualificado para execução e interpretação dos testes, estes ainda estão limitados aos laboratórios de referência.

Das corinebactérias pertencentes ao complexo XSMA, as linhagens de referência de *C. amycolatum* e de *C. striatum* tiveram recentemente seus genomas completamente sequenciados (Bio Project PRJNA31449 e PRJNA31007). O presente estudo propôs e realizou, no entanto, em parceria com grupos de pesquisa da Rede de Cooperação Acadêmica em Genômica Funcional e Biologia de Sistemas de Microrganismos, o sequenciamento por Ion Torrent do genoma completo da primeira linhagem de *C. xerosis* (PACHECO et al, 2015). Além desta, realizou o sequenciamento também de uma linhagem de *C. striatum* (MATTOS-GUARALDI et al, 2015) e de uma de *C. minutissimum* (PACHECO et al, 2015). Durante o processo de sequenciamento, ainda não havia nenhuma sequência disponível de *C. minutissimum* em banco de dados e durante o depósito da linhagem aqui sequenciada, ocorreu o depósito de uma outra linhagem, sendo a nossa linhagem o segundo depósito para a espécie. As linhagens sequenciadas neste trabalho apresentaram variabilidade bioquímica em testes *in vitro* no estudo desenvolvido por Martins e colaboradores (2009).

Até recentemente, com a ausência de informações sobre sequências genômicas destas linhagens, não era possível propor aperfeiçoamento dos princípios em que se baseiam os métodos tradicionais de identificação de corinebactérias e alguns estudos propuseram sua identificação molecular pela identificação de determinados genes através da reação em cadeia da polimerase (PCR) mas nenhuma das tentativas se revelou um teste realmente eficaz. Em 2006, o grupo de Letek e colaboradores propôs a identificação de *C. amycolatum* por PCR quantitativa em tempo real; mais tarde, em 2012, Cazanave e colaboradores propuseram pela mesma técnica a identificação de corinebactérias presentes em sítios infecciosos de próteses ortopédicas e, em 2015, Alibi e colaboradores sugeriram a identificação de *C. striatum* pelos padrões de amplificações do gene da subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) clivados por enzimas de restrição. No entanto, nenhum destes métodos fornece

discriminação suficiente entre espécies próximas ou é muito trabalhoso e pouco prático para utilização na rotina clínica (CAZANAVE et al, 2012; ALIBI et al, 2015).

1.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1.1. Doenças infecciosas emergentes

As doenças infecciosas emergentes são doenças que têm histórico de infecções em humanos mas continuam a aparecer em novas formas ou localizações geográficas após aparente controle ou eliminação (FAUCI; MORENS, 2012). Estas doenças compreendem um grande problema de Saúde Pública e estão entre as maiores causadoras de morte em todo o mundo. Ao longo da história, as doenças infecciosas emergentes causaram as maiores pandemias da história, como o vírus HIV, que já causou mais de 35 milhões de mortes em todo mundo, e a peste bubônica, que causou mais de 40 milhões de mortes. Ainda hoje, novas infecções continuam a surgir, enquanto que muitas das antigas doenças permanecem e são problemas globais (MORENS; FOLKERS; FAUCI, 2008).

Dados da Organização Mundial de Saúde demonstram que as doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortes no mundo e causam 15 milhões de mortes por ano. Nos países em desenvolvimento, estas correspondem a um terço de todas as mortes (WHO, 2015).

As doenças infecciosas emergentes são causadas por microrganismos novos ou que não tenham sido reconhecidos anteriormente (RACANIELLO, 2004) e podem se dar pela introdução do agente infeccioso em uma nova população, possivelmente em nova espécie, ou como uma variante de uma infecção humana existente seguindo estabelecimento e disseminação dentro da nova população hospedeira (MORSE, 1995). As doenças reemergentes, no entanto, apresentam-se de novas formas ou são transmitidas por outros organismos.

Um claro exemplo é a reincidência de difteria. Em países em desenvolvimento, esta doença é ocasionada por infecção pela bactéria *C. diphtheriae*. No entanto, as ocorrências de difteria causadas por linhagens toxinogênicas de *C. ulcerans* tem superado as causadas por *C. diphtheriae*. Atualmente, três espécies do gênero são capazes de produzir a toxina diftérica: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e, de modo menos frequente, *C. pseudotuberculosis* (DOMINGO et al, 2015).

O controle das doenças infecciosas emergentes ainda é complicado devido à contínua evolução de patógenos em resposta a mudanças ambientais e intervenções

médicas e ainda não é claro como a estrutura de populações influencia nestes processos adaptativos (LEVENTHAL et al, 2015).

1.1.2. Gênero *Corynebacterium spp.*, corinebactérias patogênicas e complexo XSMA

O gênero *Corynebacterium spp.* pertence à classe das Actinobactérias e compreende bactérias gram positivas que apresentam alto conteúdo de G+C em seu genoma. Morfologicamente, as bactérias deste gênero podem ser vistas como bacilos retos ou ligeiramente curvados, com extremidades afiladas (BERNARD; FUNKE, 2015). O gênero compreende, ainda, uma coleção de microorganismos morfologicamente similares, irregulares e não esporulantes (VENTURA et al, 2007; ZHI et al, 2009).

Até o ano de 2012, 88 espécies deste gênero haviam sido identificadas, sendo que 53 delas apresentam algum interesse médico ou veterinário. Estas bactérias exibem uma variedade de processos metabólicos, ou seja, podem ser fermentativas, oxidativas, assimilativas ou não reativas à maioria ou todos os substratos numa base espécie-específica (BERNARD, 2012).

A importância das corinebactérias para os microbiologistas clínicos e profissionais da saúde tem aumentado muito nos últimos anos. As espécies patogênicas deste grupo incluem as bactérias produtoras de toxina diftérica, principalmente *Corynebacterium diphtheriae*, e as *Corynebacterium spp.* não diftéricas. *C. diphtheriae* ainda é o patógeno humano mais comumente reportado dentre as espécies deste gênero e continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade em vários países.

Recentemente, isolados não-toxigênicos de *C. diphtheriae* têm emergido como agentes causadores de infecções invasivas em vários países (GOMES et al, 2009; ZASADA et al, 2010; VIGUETTI et al, 2012). Por outro lado, uma outra espécie potencialmente toxigênica, *C. ulcerans*, tem sido responsável pela reemergência da difteria no Mundo, em especial nos países desenvolvidos (WAGNER et al, 2012). O potencial zoonótico de transmissão desta espécie representa um fator importante na transmissão atual da difteria (DIAS et al, 2011).

Atualmente, o reconhecimento melhorado das corinebactérias em amostras clínicas e o crescente número de casos reportados associando as espécies não diftéricas, também chamadas de difteróides, com infecções em humanos e também em animais têm alterado a forma de manejo destas bactérias em sítios de infecções.

Apesar do aumento no número de relatos de infecções severas causadas por corinebactérias não-diftéricas emergentes, estes microrganismos são ainda, de forma errônea, frequentemente considerados como possíveis contaminantes, visto que eram encontrados em reproduções de culturas microbiológicas (CAMELLO et al, 2009; BITTAR et al, 2010; DÍEZ-AGUILAR et al, 2013; MUMCUOĞLU et al, 2015). Estes organismos são comuns de pele e mucosas e comumente encontrados no ambiente, mas o aumento de pacientes imunossuprimidos e de procedimentos invasivos, aliado ao uso frequente de antibióticos de amplo espectro, tornou comum a ocorrência de relatos de infecções oportunistas causadas por corinebactérias.

Em estudos recentes no Brasil, corinebactérias não-diftéricas do aqui referido complexo XSMA (*Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium amycolatum*) foram relatadas como importantes agentes causadores de infecções em pacientes com câncer (MARTINS et al, 2009). Estas bactérias têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo ferimentos cirúrgicos, trato urinário, trato respiratório, tumores ulcerados e cateteres venosos. A espécie mais comumente isolada é *C. amycolatum* e, mais recentemente, tem sido relatado também um aumento na incidência de outra corinebactéria patogênica emergente, *C. pseudodiphtheriticum* (CAMELLO et al, 2009). Esta espécie também foi identificada como causadora de um surto recente de infecções respiratórias em crianças com fibrose cística, na França (BITTAR et al, 2010).

Vários estudos têm descrito *C. striatum* como agente causativos de infecções como pneumonia (TARR et al, 2003), osteomielite vertebral (FERNANDEZ-AYALA et al, 2001), septicemia (MARTIN et al, 2003), artrite séptica (WESTBLADE, 2014) e endocardite (RUFANEL; COHN, 1994). De modo similar, *C. amycolatum* vem sendo identificada em diversos casos de infecções nosocomiais em pacientes submetidos a processos invasivos, tais como cirurgias, inserção de próteses e cateteres venosos (KNOX; HOLMES, 2002) em pacientes imunossuprimidos ou que tenham feito tratamentos com antibióticos de amplo espectro, ou, ainda, em pacientes com câncer (MARTINS et al, 2009).

C. minutissimum já foi descrita como causadora de abscessos de mama (BERGER et al, 1984), abscessos costochondrais em pacientes infectados por HIV (BANDERA et al, 2000), infecções associadas a cateteres (RUPP et al, 1998) e meningite (DALAL; LIKHI, 2008) e *C. xerosis* como causadora de osteomielite (KRISH; SARUBBI, VERGHESE, 1989), artrite séptica (VALESTEIN et al, 1988), mediastinite (LORTHOLARY et al, 1993) pneumonia em paciente com leucemia aguda (ANÍA, 1994) e endocardite (PESSANHA et al 2003).

1.1.3. Identificação das espécies e papel no correto diagnóstico

As dificuldades associadas à identificação de bactérias patogênicas emergentes representam um sério problema para o rápido diagnóstico de diversas infecções humanas nos laboratórios de microbiologia clínica. É crescente o número de relatos na literatura de infecções oportunistas e infecções nosocomiais causadas por espécies patogênicas emergentes do gênero *Corynebacterium spp.* e não é incomum encontrar trabalhos relatando identificações ambíguas e até mesmo incorretas destas bactérias pelos métodos mais amplamente utilizados, que se baseiam principalmente em características morfológicas e testes bioquímicos (CONTZEN et al, 2011; DIAS et al, 2011; DÍEZ-AGUILAR et al, 2013).

Ainda assim, a empresa líder mundial no fornecimento de kits semi-automatizados para identificação bioquímica de corinebactérias, a bioMérieux, tem registrado aumento significativo nas suas vendas para países do bloco de mercados emergentes, incluindo o Brasil (bioMérieux, Annual Report, 2014).

A identificação rápida e correta de corinebactérias patogênicas emergentes é necessária por várias razões. Embora estas bactérias sejam geralmente de baixa virulência, as infecções que elas causam podem ser muito severas ou até mesmo fatais quando a terapia antimicrobiana efetiva não é iniciada precocemente, tendo sido demonstrada a resistência múltipla a antibióticos em corinebactérias do aqui referido complexo XSMA em estudos recentes (BERNARD; PACHECO, 2015). Além disso, a correta identificação propicia o reconhecimento de origem de surtos e contribui para o relato de dados epidemiológicos.

Atualmente, o auxílio de métodos moleculares baseados no sequenciamento de genes específicos e, mais recentemente, o uso de espectrometria de massas do

tipo MALDI-TOF tem contribuído bastante para melhorar a identificação de corinebactérias (FARFOUR et al, 2012; VILA et al, 2012; GOMILA et al, 2012). No entanto, estes métodos ainda não são acessíveis para a maioria dos laboratórios clínicos, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (GILJOHANN & MIRKIN, 2009; SAUER & KLIEM, 2010). Portanto, torna-se clara a necessidade de estudos para aumentar a confiabilidade da identificação de corinebactérias pelos métodos laboratoriais de mais amplo acesso.

As vantagens e desvantagens das técnicas mais comumente utilizadas estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens das técnicas de identificação de corinebactérias mais utilizadas

Método	Vantagens	Desvantagens
Api Coryne	Relativamente barato, de fácil execução e interpretação	Algumas bactérias são mal identificadas ou não identificadas; há limitado número de substratos no painel, que não fornecem número suficiente de elementos funcionais únicos para a diferenciação entre táxons relevantes. Os bancos de dados são atualizados com baixa frequência e há falhas na descrição de espécies recentemente descobertas os painéis utilizados são caros; os resultados para alguns sistemas são obtidos em dias.
Vitek 2	Fornecer resultados de identificação a nível de espécie, e sensibilidade a agentes antimicrobianos; Método automatizado após a preparação do inóculo-teste	Algumas bactérias são mal identificadas ou não identificadas; há limitado número de substratos no painel, que não fornecem número suficiente de elementos funcionais únicos para a diferenciação entre táxons relevantes. Os bancos de dados são atualizados com baixa frequência e há falhas na descrição de espécies recentemente

Sequenciamento do gene 16S <i>rRNA</i>	Sequenciamento parcial do gene promove a caracterização inicial das espécies;	descobertas os painéis utilizados são caros; os resultados para alguns sistemas são obtidos em dias.
Sequenciamento do gene <i>rpoB</i>	Sequenciamento parcial ou total do <i>rpoB</i> é utilizado para identificação definitiva de corinebactérias quando a identificação pelo sequenciamento do 16S rRNA falha	Baixa discriminação entre espécies muito próximas; método caro, trabalhoso; necessidade de pessoal treinado, método relativamente demorado; sequencias não registradas para muitas corinebactérias Não há sequências de referência para todas as espécies; método caro e trabalhoso; necessidade de pessoal treinado; método relativamente demorado.
MALDI-TOF	Rápidos resultados, boa reprodutibilidade, pode ser realizado pela aplicação direta da colônia, dispensa a necessidade de cultivo, baixo custo por reação	Alto custo de aquisição do equipamento, banco de dados limitados, resultados podem identificar apenas a nível de gênero ou ser inconclusivos, dependente de linhagens de referências incluídas em seus bancos de dados. Necessidade de tratamento das amostras para melhores resultados de identificação, não consegue diferenciar espécies com perfis bioquímicos similares, não permite tipagem de padrões de resistência a antibióticos.

1.1.3.1. Métodos fenotípicos e API Coryne™

A estratégia mais disseminada para identificação de corinebactérias tem sido a combinação de análise morfológica, após coloração de Gram, pela visualização em

microscópio de luz, com a avaliação das características bioquímicas. Em geral, os testes fenotípicos são utilizados para avaliar o requerimento de fontes de carbono específicas para o crescimento, bem como a utilização de outros elementos, como oxigênio, dióxido de carbono ou outros nutrientes e avaliação de reações bioquímicas, como metabolismo de açúcares e produção de enzimas específicas (LAU et al, 2015). Estas reações foram, com o tempo, sendo utilizadas em vários sistemas comerciais semi-automatizados de testes bioquímicos desenvolvidos para uso nos laboratórios de diagnóstico clínico, incluindo o API Coryne™ (SOTO et al, 1994; FUNKE & BERNARD, 2007; ADDERSON et al, 2008).

A identificação confiável destas corinebactérias patogênicas emergentes por métodos fenotípicos convencionais é considerada difícil, uma vez que suas características bioquímicas são bastante similares. Acredita-se que praticamente todos os isolados de *C. xerosis* que foram relatados na literatura até o ano de 1996 devem ter sido erroneamente identificados como *C. amycolatum* (FUNKE et al, 1996). O mesmo acontecia com *C. striatum*, que era frequentemente identificada como *C. xerosis*.

Por serem consideradas no passado como raramente encontradas em amostras clínicas, algumas destas espécies emergentes não estavam incluídas em bancos de dados de identificação semiautomatizada até recentemente. De fato, os avanços atuais nos métodos de identificação de *Corynebacterium spp.* têm mostrado que o gênero exibe complexidade taxonômica considerável e que os marcadores fenotípicos normalmente utilizados podem ser ambíguos (ADDERSON et al, 2008; MARTINS et al, 2009; VILA et a., 2012).

A bateria bioquímica do teste API Coryne consiste de 20 microtubos contendo substratos desidratados para a demonstração de atividades enzimáticas ou de fermentação de carboidratos. A adição de uma suspensão densa de bactérias pré-cultivadas re-hidrata os substratos enzimáticos. Os produtos finais de metabolismo durante a incubação são detectados através de reações coloridas espontaneamente ou após a adição de reagentes específicos. Os testes de fermentação são inoculados com um meio de enriquecimento (contendo indicador de pH) que reconstitui os substratos de carboidrato. A fermentação é detectada por mudança de cor no indicador de pH (SOTO et al, 1994; FUNKE et al, 1997; ADDERSON et al, 2008).

O sistema de identificação leva entre 16 e 48 horas após o isolamento da colônia suspeita em placas e pode frequentemente render resultados ambíguos. Isto se deve em parte ao fato de que o banco de dados atual de referências disponibiliza códigos API definidos para as espécies de corinebactérias patogênicas mais comumente encontradas, enquanto que espécies raramente encontradas, tais como patógenos emergentes, ainda não foram incluídas (KONRAD; HÖRMANSDORFER; SING, 2015; VILA et al, 2012). Além disso, a grande variabilidade bioquímica destas bactérias, como ocorre entre os isolados do complexo XSMA de corinebactérias emergentes, limita muito a identificação em nível de espécie.

Mesmo com o crescimento dos bancos de dados de identificação, até mesmo a diferenciação das espécies potencialmente produtoras de toxina diftérica (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*) continua complicada com os sistemas comercialmente disponíveis na atualidade (CONTZEN et al, 2011; VENEZIA et al, 2012). Recentemente, o banco de dados do API Coryne foi atualizado para a versão v. 3.0, e, dentre as espécies do complexo XSMA, nenhuma delas é identificada corretamente apenas por este teste. As espécies *C. striatum*, *C. minutissimum* e *C. amycolatum* agora só podem ser identificadas corretamente com a realização de testes adicionais e a espécie *C. xerosis* foi retirada do banco de dados do sistema.

De acordo com Funke e colaboradores (1997) as limitações para o uso de testes fenotípicos como único método de identificação para corinebactérias incluem identificações incorretas ou nenhuma identificação, limitado número de substratos nos painéis que não fornecem número suficiente de elementos funcionais únicos para diferenciar entre táxons relevantes, que é exacerbado para linhagens metabolicamente inertes, que apresentam crescimento demorado ou que tenham expressão similar de resultados fenotípicos como, *C. amycolatum* e *C. xerosis*; bancos de dados atualizados com baixa frequência e que não são capazes de identificar novas espécies descritas; os painéis são caros com custo crescente de acordo com o aumento do número de substratos encontrados no painel e, por fim, os resultados para alguns sistemas são obtidos após dias, em vez de horas. Em resumo, a identificação fenotípica como único método é razoavelmente satisfatória para espécies de *Corynebacterium spp.* mais comuns que crescem bem dentro de 24-48h e que sejam reativas (não inertes), em respeito aos substratos encontrados nos sistemas de teste mais comumente encontrados, mas é recomendado que quando a identificação

definitiva da espécie é requerida, que as linhagens sejam analisadas utilizando métodos de identificação molecular, nos quais os resultados de testes bioquímicos corroborem com a caracterização genética comparado aos algoritmos comumente utilizados.

1.1.3.2. Métodos moleculares baseados em sequências

O uso de métodos moleculares tem surgido nos últimos anos como boa alternativa para identificação específica destas corinebactérias do grupo de *C. diphtheriae*. O estabelecimento de relação filogenética e a identificação molecular por amplificação e sequenciamento de genes tais como o gene *16S rRNA* ou o gene *rpoB* tem mostrado resultados promissores para algumas bactérias (KHAMIS; RAOULT; LA SCOLA, 2005, 2005) e apesar de o sequenciamento destes genes ser considerado padrão ouro para a identificação de bactérias, este método apresenta limitações e não é completamente eficiente para a identificação de algumas corinebactérias. Geralmente é necessário o sequenciamento total do gene, cujo tamanho é de 1.500 pares de base, que não é tipicamente utilizado em laboratórios de microbiologia clínica (ALATOOM et al, 2012).

Espécies muito próximas podem possuir diferenças mínimas em seus genomas, em especial quando um único gene é utilizado para diferenciação entre espécies. A identificação em nível de espécie por sequenciamento do gene do 16S rRNA é dada normalmente quando a sequência obtida para um isolado clínico apresenta similaridade > 97% com a de um microrganismo de referência. Contudo, quando a sequência quase total deste gene é obtida e comparada com a de linhagens de referência, algumas espécies estão relacionadas com um grau de variância que é apenas $\leq 2\%$. Ainda, as espécies que apresentam essa limitação são: *C. afermentans*, *C. coyleae*, *C. mucifaciens* (<2%); *C. aurimucosum*, *C. minutissimum* e *C. singulare* (<2%); *C. sundsvallense* e *C. thomssenii* (<1,5%); *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* (<1% entre si e <2% com *C. diphtheriae*); *C. propinquum* e *C. pseudodiphtheriticum* (<2%); *C. xerosisi*, *C. freneyi* e *C. hansenii* (<2%) e *C. macginleyi* e *C. accolens* (<2%) (BERNARD; FUNKE, 2015).

Quando a identificação por sequenciamento de *16S rRNA* é insuficiente, comumente utiliza-se o sequenciamento do *rpoB* como método definitivo, mas o banco

de sequências de referência para comparação ainda não abrange todas as espécies do gênero *Corynebacterium spp.* Além do sequenciamento deste gene, recentemente foi proposto um teste da detecção dos padrões de restrição do gene *rpoB* baseado em amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Apesar dos bons resultados encontrados, esta ainda é uma metodologia trabalhosa, demorada e ainda necessita de validação mais ampla (ALIBI et al, 2015).

Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, diversas espécies têm hoje a sequência completa de seus genomas disponível e novos genes únicos para determinada espécie podem ser identificados e, em vez de sequenciar um gene marcador ortólogo como o *16S rRNA*, e subsequentemente determinar a posição filogenética do isolado em questão para alcançar a identificação. A detecção de genes alvo espécie-específicos representa uma abordagem mais precisa que pode ser facilmente incorporada em laboratórios clínicos. A tipagem de genes espécie-específicos oferece uma resposta não ambígua do tipo “sim” ou “não” para a identidade de um organismo e estudos tem demonstrado que a amplificação de um conjunto de genes espécie-específico, quando em formato multiplex, já mostraram resolução igual ou maior a outras metodologias comumente utilizadas, como a eletroforese em gel de campo pulsado (LAU et al, 2015; CORNELIUS et al, 2010).

Com a redução dos custos dos sequenciamentos de nova geração em relação ao sequenciamento tradicional de Sanger, o sequenciamento de genomas não só permite agora rápida identificação bacteriana como também pode oferecer uma resolução molecular definitiva que pode ser superior a quaisquer testes fenotípicos e genotípicos. Esta metodologia pode também ser utilizada quando os testes de diagnóstico considerados padrão falham consistentemente, seja por se tratar de um patógeno incomum ou uma variante de um patógeno conhecido que leva a resultados falso negativos (KÖSER et al, 2012).

1.1.3.3. Espectrometria de massas

Uma revolução ainda mais recente no campo de identificação de bactérias patogênicas tem sido a implementação dos métodos baseados em espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e do sistema Vitek MS (bioMérieux), um sistema de espectrometria de massas desenvolvido especificamente para identificação

bacteriana, dentre outros sistemas especificamente por se tratarem de métodos muito rápidos e, apesar do custo alto de aquisição do equipamento, o valor de cada análise é baixo (ALIBI et al, 2015; BERNARD, 2012). Alguns trabalhos já avaliaram a confiabilidade destes métodos para identificação específica de corinebactérias (KONRAD; HÖRMANSDORFER; SING, 2015; FARFOUR et al, 2012; VILA et al, 2012).

A espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF basicamente consiste na ionização de proteínas bacterianas detectadas por um espectrômetro de massas e estes padrões de ionização, com base em sua relação entre massa e carga dessas frações proteicas são comparados com entradas pré-carregadas em bancos de dados e gerando um resultado que tem como base um grau de concordância entre estes padrões (ALATOOM et al, 2012).

De forma geral, estes trabalhos vêm relatando melhoras consideráveis em relação aos métodos de identificação convencionais, apesar de que resultados ambíguos ainda têm sido observados. Porém, os recentes estudos publicados sobre identificação de corinebactérias por espectrometria de massas ainda relatam identificações ambíguas e os diferentes sistemas têm limitações na variedade de espécies em seus bancos de dados, que também não são atualizados com frequência adequada (SZEMRAJ et al, 2014; SCHULTHESS et al, 2014; BERNARD, 2012).

Atualmente, ainda há clara discordância entre os resultados gerados por sistemas de identificação bioquímica e por métodos baseados em espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Isto se deve principalmente ao reduzido número de perfis de espectrometria de massas de linhagens de corinebactérias emergentes existentes nos bancos de dados atuais e à variabilidade bioquímica dos isolados de corinebactérias.

1.1.4. Resistência múltipla a agentes antimicrobianos

Estudos realizados pelo *Center of Diseases Control* (CDC) demonstram que a taxa de infecções graves por bactérias com resistência múltipla é ainda maior nos países em desenvolvimento e, em geral, os pacientes que contraem infecções por bactérias resistentes tem pior prognóstico e maior risco de morte que indivíduos infectados por bactérias da mesma espécie que são sensíveis a agentes

antimicrobianos, além de necessitarem de mais recursos médicos (WHO, 2015). As espécies de corinebactérias patogênicas mais encontradas, no entanto apresentam resistência múltipla a antibióticos. Por definição, são considerados micro-organismos com resistência múltipla os que apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al, 2012).

Em 2015 o grupo de Bernard e colaboradores testou a atividade de agentes antimicrobianos contra linhagens de corinebactérias e pode observar que 20 diferentes espécies apresentaram resistência múltipla. Dentre os achados, verificaram que *C. amycolatum* era resistente a 10 diferentes classes de antibióticos, *C. striatum* a 9 classes, *C. xerosis* a 3 classes (BERNARD; PACHECO, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

As dificuldades associadas à identificação de bactérias patogênicas emergentes representam um sério impedimento para o rápido diagnóstico de diversas infecções humanas nos laboratórios de microbiologia clínica. O número de espécies do gênero *Corynebacterium spp.* identificadas como causadoras de infecções oportunistas e hospitalares em humanos vem crescendo bastante atualmente e a importância das corinebactérias para os microbiologistas clínicos e profissionais da saúde aumentou muito nos últimos anos.

Em estudos recentes no Brasil, corinebactérias não-diftéricas do complexo X SMA (*Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium amycolatum*) foram relatadas como importantes agentes causadores de infecções em pacientes com câncer. Estas bactérias têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo ferimentos cirúrgicos, trato urinário, trato respiratório, tumores ulcerados e cateteres venosos. As espécies mais comumente isoladas são *C. amycolatum/C. xerosis* e *C. minutissimum* (MARTINS et al, 2009). Tem sido relatado também um aumento na incidência de outra corinebactéria patogênica emergente, *C. pseudodiphtheriticum*. Esta espécie também foi identificada como causadora de um surto de infecções respiratórias recentes em crianças com fibrose cística, na França (BITTAR et al, 2010).

A identificação rápida e confiável de corinebactérias patogênicas emergentes é essencial. No entanto, não é incomum encontrar trabalhos relatando identificações ambíguas e até mesmo incorretas destas bactérias pelos métodos mais amplamente utilizados, que se baseiam principalmente em testes bioquímicos, como o sistema API (Rapid) Coryne. Ainda assim, a empresa líder mundial no fornecimento de kits semi-automatizados para identificação bioquímica de corinebactérias, a bioMérieux, registrou no último ano um aumento significativo nas suas vendas para países do bloco de mercados emergentes, incluindo o Brasil, e apesar de testes *in vitro* representarem gastos aproximados de 4% de todos os valores gastos em hospitais, seus resultados impactam 70% das decisões médicas, influenciando diretamente no sucesso do tratamento de pacientes (BioMérieux, 2013).

Atualmente, o auxílio de métodos moleculares baseados no sequenciamento de genes específicos e, mais recentemente, o uso de espectrometria de massas do

tipo MALDI-TOF tem contribuído bastante para melhorar a identificação de corinebactérias. Porém, estes métodos ainda não são acessíveis para a maioria dos laboratórios clínicos, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Além disso, é clara a discordância que ainda existe entre os resultados gerados por sistemas de identificação bioquímica e por métodos baseados em espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Isto se deve principalmente à grande variabilidade bioquímica dos isolados de corinebactérias e ao reduzido número de perfis de espectrometria de massas de linhagens de corinebactérias emergentes existentes nos bancos de dados atuais.

O aumento da importância clínica desses novos patógenos leva à necessidade do conhecimento de suas susceptibilidades a agentes antimicrobianos atualmente disponíveis. Apesar de os dados ainda serem limitados, as espécies pertencentes ao complexo XSMa tem mostrado um fenótipo resistente a múltiplos antibióticos (BERNARD et al, 2015).

Neste contexto, o principal objetivo deste projeto é utilizar métodos de genômica estrutural e funcional numa estratégia sistêmica para entender a variabilidade genética existente entre diferentes isolados de corinebactérias patogênicas emergentes, tornando possível a identificação de novos genes únicos de cada espécie emergente e fomentando a proposição de novos testes que poderão ser utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica para rápida identificação destas bactérias. Espera-se que os resultados gerados neste trabalho contribuam significativamente para a identificação rápida e segura destas corinebactérias no futuro próximo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar análises genômicas comparativas de diferentes isolados de corinebactérias patogênicas emergentes para detecção de novos genes que facilitarão a identificação rápida e confiável destas bactérias em laboratórios de microbiologia clínica.

3.2. Objetivos Específicos

- Sequenciar completamente e montar os genomas de três espécies de corinebactérias patogênicas emergentes, incluindo isolados clínicos com variabilidade bioquímica;
- Realizar anotação semi-automatizada de todas as sequências genômicas geradas;
- Realizar análises genômicas comparativas das corinebactérias patogênicas emergentes sequenciadas;
- Identificar genes únicos das linhagens de corinebactérias patogênicas emergentes sequenciadas e propor novos testes moleculares para identificação rápida destas bactérias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste trabalho está esquematizada na Figura 1 e será descrita em detalhes nos próximos tópicos.

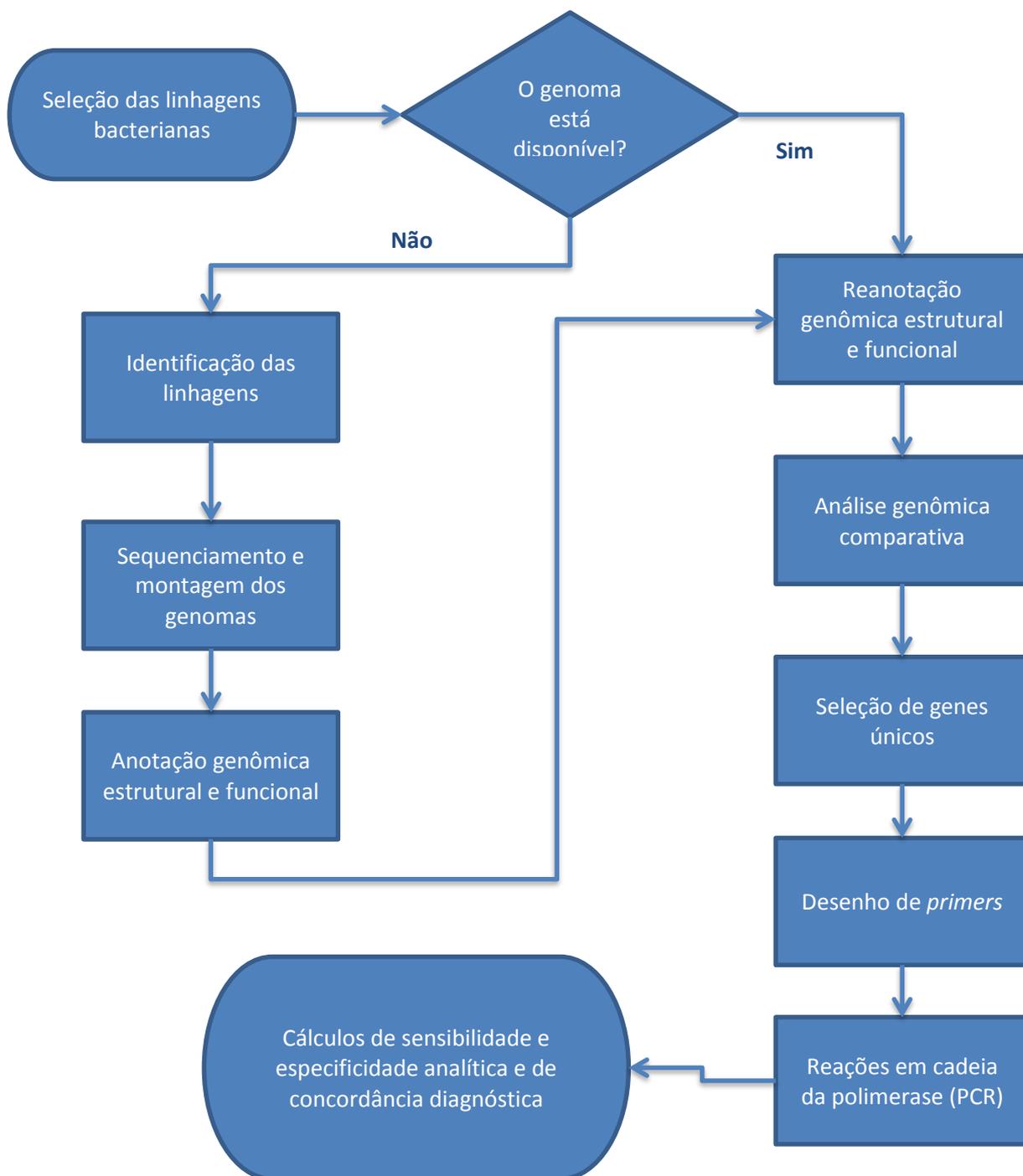


Figura 1 – Fluxograma geral da metodologia utilizada neste trabalho. O fluxograma completo foi utilizado para as linhagens que não possuíam genomas sequenciados e disponíveis publicamente em bancos de dados. Quando o genoma já estava disponível, os passos foram realizados a partir da Reanotação genômica estrutural e funcional

4.1. Linhagens bacterianas

Neste estudo, foram utilizadas diferentes linhagens das corinebactérias do aqui chamado grupo XSMA, para sequenciamento, análise genômica comparativa e avaliação de testes de identificação molecular.

As linhagens sequenciadas foram:

- *Corynebacterium xerosis* ATCC 373^T (LEHMANN; NEUMANN, 1986)
- *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09 (SOUZA et al, 2015)
- *Corynebacterium minutissimum* 1941 (MARTINS et al, 2009)

Linhagem cuja sequência genômica foi obtida do banco de dados do NCBI:

- *Corynebacterium amycolatum* SK46 (Humam Microbiome Project ID 0282)

Linhagens utilizadas para testes moleculares e suas validações:

- *Corynebacterium amycolatum* 2354 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium amycolatum* 2459 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium amycolatum* 2407 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2103 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2308 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2324 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2376 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2390 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2401 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2432 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium striatum* 2454 (RAMOS, 2014)
- *Corynebacterium minutissimum* 2422 (RAMOS, 2014)

As linhagens utilizadas para realização e validação dos testes moleculares foram obtidas, previamente isoladas e caracterizadas fenotipicamente por cultivo bacteriano e provas bioquímicas convencionais API Coryne e Vitek 2 (RAMOS, 2014). Os resultados de identificação para as linhagens de referência estão compilados na Tabela 2, com exceção de *Corynebacterium xerosis* ATCC 373^T, que é uma linhagem de referência para a espécie, já bem caracterizada. As linhagens contidas na Tabela 3 apresentavam identificação ambígua ou divergente entre os métodos utilizados e também foram utilizadas para compor os testes de PCR. A identificação final das linhagens foi dada pelo resultado de identificação do sequenciamento do gene *rpoB*.

Tabela 2 - Caracterização bioquímica e genotípica das linhagens utilizadas como referência nos testes moleculares

Linhagem	API Coryne	Vitek 2	16S rRNA*	rpoB*
2354	<i>Corynebacterium Group G</i>	<i>C. amycolatum</i>	99,06% <i>C. amycolatum</i>	96,52% <i>C. amycolatum</i>
2422	<i>C. striatum/amycolatum</i>	Não realizado	99,02% <i>C. singulare</i>	97,83% <i>C. minutissimum</i>
2454	<i>C. striatum/amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	99,03% <i>C. striatum</i>	97,1% <i>C. striatum</i>
<i>C. xerosis</i> 373 ^T	Linhagem de referência bem caracterizada por testes bioquímicos e moleculares, incluindo sequenciamento dos genes 16S rRNA e rpoB (American Type Culture Collection – ATCC, dados não disponíveis)			

Adaptado: RAMOS, J. Dissertação de Mestrado, UERJ, 2014.

* Porcentagem de similaridades entre sequências do gene contra o banco de dados.

Tabela 3 – Caracterização bioquímica e genotípica das demais linhagens utilizadas para avaliação dos testes moleculares

Linhagem	API Coryne	Vitek 2	16S rRNA*	rpoB*
2103	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. striatum</i>	99,77% <i>C. striatum</i>	96,65% <i>C. striatum</i>

2308	<i>C. striatum/amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	98,96% <i>C. striatum</i>	97,11% <i>C. striatum</i>
2324	<i>C. afermentans/coyleae</i>	<i>C. minutissimum</i>	99,69% <i>C. striatum</i>	96,89% <i>C. striatum</i>
2376	<i>C. macginley</i>	Não realizado	99,12% <i>C. striatum</i>	97,12% <i>C. striatum</i>
2390	Não realizado	<i>C. striatum</i>	99,39% <i>C. striatum</i>	98,04% <i>C. striatum</i>
2401	Não realizado	<i>C. striatum</i>	99,45% <i>C. striatum</i>	97,12% <i>C. striatum</i>
2407	<i>C. striatum/amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	99,14% <i>C. amycolatum</i>	98,76% <i>C. amycolatum</i>
2432	<i>C. striatum/amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	99,77% <i>C. striatum</i>	99,28% <i>C. striatum</i>
2459	<i>C. striatum/amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	99,14% <i>C. amycolatum</i>	98,74% <i>C. amycolatum</i>

Adaptado: RAMOS, J. Dissertação de Mestrado, UERJ, 2014.

* Porcentagem de similaridades entre seqüências do gene contra o banco de dados.

4.2. Sequenciamento genômico por métodos de nova geração e montagem dos genomas

O DNA genômico dos isolados de *C. xerosis* ATCC 373^T, *C. minutissimum* 1941 e de *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 foi extraído utilizando o QIAamp DNA minikit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante e o sequenciamento de DNA foi feito utilizando a plataforma Ion Torrent PGM (Life Technologies) com chip 318, utilizando bibliotecas de fragmentos. Montagens *de novo* das seqüências em contigs foi realizada utilizando os montadores MIRA (CHEVREUX; WETTER; SUHAI, S. 1999) e SPAdes (BANKEVICH et al, 2012), e a curadoria para redução de *gaps* foi feita com Lasergene v.11 Suite (DNASTAR). As seqüências genômicas totais geradas foram depositadas no DDBJ/EMBL/GenBank sob os números de acesso LAYS00000000 (*C.*

xerosis ATCC 373T), LAYQ00000000 (*C. minutissimum* 1941) e LAYR00000000 (*C. striatum* 1961 BR-RJ/09). Esta etapa foi realizada por colaboradores do Laboratório de Polimorfismo de DNA, da Universidade Federal do Pará sob coordenação do Doutor Rommel Thiago Jucá Ramos.

4.3. Anotação genômica

O arquivo contendo cada sequência genômica obtida no formato FASTA foi utilizado como entrada para a anotação genômica funcional, realizada de modo semi-automatizado por meio do servidor RAST (AZIZ et al, 2008). Após o envio do arquivo das sequências, utilizamos o esquema de anotação Classic RAST e optamos pela correção automática de erros e correção de frameshifts das sequências, bem como pelo preenchimento de *gaps*. Os demais parâmetros não foram alterados.

4.4. Análise genômica comparativa e seleção de genes únicos

As sequências genômicas das linhagens sequenciadas foram analisadas comparativamente utilizando o software EDGAR (*Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios*) de acordo como descrito por Blom e colaboradores (2009) após a anotação estrutural, ou seja, após a localização de genes e elementos funcionais como RNAs no genoma recém sequenciado. Sequências genômicas únicas foram obtidas pela análise de Singletons e um diagrama de Venn foi gerado. Outras análises de busca foram realizadas utilizando o ambiente SEED Viewer (OVERBEEK et al, 2014) através de reconstrução preliminar de funções biológicas e comparação entre espécies.

As sequências encontradas como únicas para cada espécie no EDGAR e no SEED foram pré-selecionadas como candidatas a genes únicos. A filtragem destes genes foi dada inicialmente pela eliminação de genes hipotéticos, ou seja, de regiões do genoma que continham códons de iniciação e de terminação, mas que não possuíam anotação funcional, dado o grande volume de sequências encontradas.

Após esta filtragem, genes foram analisados manualmente pela ferramenta BLASTn, disponível no NCBI, um tipo de alinhamento local que utiliza sequências nucleotídicas como entrada e procura por similaridade em bancos de dados de

nucleotídeos. Por este banco de dados ser menos acurado, análises também foram realizadas por BLASTx, outra ferramenta disponível no NCBI, mas que utiliza como entrada sequências nucleotídicas e procura por similaridades em um banco de dados de proteínas traduzidas. A busca foi limitada ao gênero *Corynebacterium spp.* e foi utilizado banco de dados não redundante (nr), para evitar que alinhamentos fossem encontrados ao acaso.

Alinhamentos de BLAST que possuíam *e-value* maior que 10^{-4} , e identidade e cobertura maiores que 70% foram descartados da análise e foi também selecionado um gene comum a todas as quatro espécies do complexo XSMA para que pudesse ser utilizado como marcador do gênero. No final, foram consideradas como únicos os genes que, após os BLASTs, não possuíam similaridades de sequências significativas entre as nossas espécies de estudo e espécies relacionadas e gene comum ao gênero aquele que apresentasse similaridade entre as quatro espécies do estudo.

4.5. Desenho de *primers*

Primers para reações de PCR foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer-BLAST* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/Primer-blast/>). Nesta etapa, a sequência de nucleotídeos dos genes únicos selecionados foi utilizada como entrada e o tamanho do produto de PCR (amplicon) foi configurado entre 50 e 150 pb para *C. xerosis*, 150 pb e 250 pb para *C. striatum*, 250 pb e 350 pb para *C. minutissimum*, 350 pb e 450 para *C. amycolatum* e entre 450 pb e 550 pb para o gene marcador do gênero. Tamanhos diferentes de produtos amplificados foram escolhidos para que não houvesse sobreposição de bandas correspondentes aos amplicons e comprometimento da leitura e interpretação dos resultados de PCR por eletroforese em gel de agarose. Também foi utilizado banco de dados não redundante e o gênero *Corynebacterium spp.* como parâmetros de verificação da especificidade dos *primers*. Outros parâmetros não foram alterados.

Reações de PCR virtual foram realizadas utilizando a mesma ferramenta para verificar a eficiência dos *primers*. Neste caso, em vez de utilizar as sequências dos genes, foram utilizadas as sequências dos *primers* obtidos pela etapa anterior. Os parâmetros utilizados para a PCR virtual foram os mesmos utilizados no desenho de *primers*. Alinhamentos das sequências gênicas completas traduzidas foram feitos

utilizando a ferramenta ClustalO e visualizados no JalView para verificar as regiões de anelamento dos *primers* de forma a reduzir ainda mais a possibilidade de amplificação inespecífica de genes de outras espécies.

4.6. Reações de PCR

As reações de PCR foram preparadas em microtubos realizadas em termociclador (Applied Biosystems), conforme descrito na Tabela 4. Os *primers* utilizados nesta etapa foram gerados neste trabalho e estão descritos em maiores detalhes na Tabela 5. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% corados com *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen).

Tabela 4 - Sistemas e condições de PCR utilizados

Sistemas e Reagentes	Concentração Final	Condições dos ciclos
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity		
Tp 10X	1x	P1: 94°C por 3 min
Taq Platinum	0,5U	P2: 94°C por 30 seg
MgSO ₄ 50 mM	1,5 mM	P3: 65°C ou 58°C por 40 seg
dNTP Mix10 mM	0,2 mM	P4: 68°C por 1 min ou 50s
<i>Primer F</i> 10 µM	2 µM	P5: 30X de P2 a P4
<i>Primer R</i> 10 µM	2 µM	P6: 68°C por 3 min
DNA Molde	20-40ng	P7: 4°C ∞
H2O	q.s.p. 10 µl	
Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (1)		
5X Q5 Reaction Buffer	1x	P1: 98°C por 3 min
Q5® Hot Start High-		P2: 98°C por 10 seg
Fidelity DNA Polymerase	0,02U	P3: 65°C por 30 seg
dNTP Mix10 mM	0,2 mM	P4: 72°C por 30s
		P5: 30X de P2 a P4

<i>Primer F</i> 10 µM	0,5 µM	P6: 72°C por 3 min
<i>Primer R</i> 10 µM	0,5 µM	P7: 4°C ∞
5X Q5 High GC Enhancer	1X	
DNA Molde	20-40ng	
H ₂ O	q.s.p. 10 µl	

Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2)

5X Q5 Reaction Buffer	1x	P1: 94°C por 3 min
Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0,02U	P2: 94°C por 30 seg
dNTP Mix 10 mM	0,2 mM	P3: 60°C por 40 seg
<i>Primer F</i> 10 µM	0,5 µM	P4: 72°C por 50s
<i>Primer R</i> 10 µM	0,5 µM	P5: 30X de P2 a P4
DNA Molde	20-40ng	P6: 72°C por 3 min
H ₂ O	q.s.p. 10 µl	P7: 4°C ∞

Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (3)

5X Q5 Reaction Buffer	1x	P1: 94°C por 3 min
Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0,02U	P2: 94°C por 30 seg
dNTP Mix 10 mM	0,2 mM	P3: 63°C por 40 seg
<i>Primer F</i> 10 µM	0,5 µM	P4: 72°C por 50s
<i>Primer R</i> 10 µM	0,5 µM	P5: 30X de P2 a P4
DNA Molde	20-40ng	P6: 72°C por 3 min
H ₂ O	q.s.p. 10 µl	P7: 4°C ∞

Tabela 5 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR

<i>Primer</i>	Sequência 5' -> 3'	Função Biológica	Tamanho esperado do amplicon
Cory-F	CAGGACTGGATCGACCACGACCCGAAG	Provável	513 pb
Cory-R	CTCGGAGTAGCGGGCGCCGATGCG	esterase	
Cxer-F	CGTGGACGAGGCTGGAATC	Provável	106 pb
Cxer-R	ACCAGTTTCGGGGTGAGGA	permease envolvida no transporte de drogas e metabólitos	
Cstr-F	CTTCGAAGAACATGAAGGCA	Permease	226 pb
Cstr-R	CCGTAGTACATCGCTACGGC	envolvida no transporte de ferro	
Cmin-F1	TATGATTTTCGGGCGCTCGTT	Proteína de membrana de função	304 pb
Cmin-R1	CAATCACCGCACCAATGACC	desconhecida	
Cmin-F2	GCGCTCGTTCATAAACTCCG	Proteína de membrana e função	311 pb
Cmin-R2	CGTTATTCCACAGCCACCCA	desconhecida	
Cmin-F3	AAAACATTGTGCTCGGTCGC	Transportador	296 pb
Cmin-R3	GATAAACACCATCGCCACGC	de ribose	
Cmin-F4	CGTCAGCGCATAACTCTTGC	Transportador	317 pb
Cmin-R4	ACATTGTGCGGAGGCAACCAT	de ribose	
Camy-F1	GTGCCCAGTCATAACCAGCTT	Componente da enterobactina	413 pb
Camy-R1	CAAGCCCTACTTGCACTCCA	sintetase	
Camy-F2	ATGACCAAGACGGATGCTGG	Lisofosfolipase	434 pb

Camy- R2	TTGGTGGGAACGAAACCACA		
Camy- F3	CGTTATCCAGCAAATCGGCG	Transportador de carboidratos	402 pb
Camy- R3	ACTCTAGCCACCAACATCGC		
Camy- F4	GGTGGCCGCTGAATTTGAAG	Transferase	416 pb
Camy- R4	CGGGAACGTCCTTAGTCACC		

4.6.1. Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados a 1,5% dissolvendo a agarose (Sigma) em tampão Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE) 1X por aquecimento e acrescentando-se SYBR[®] Safe DNA gel stain na proporção de 10 µl de SYBR[®] Safe para cada 1 ml de gel. Em cada poço, foram aplicados 5 µl do produto da PCR e 1 µl do tampão de amostra, excetuando-se no primeiro poço, que foram aplicados 5 µl do marcador de peso molecular (Invitrogen) e 1 µl de tampão de amostra. As corridas de eletroforese foram realizadas em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 90 volts por aproximadamente 35 minutos. Após a corrida, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com o equipamento LPIX Transilluminator (Loccus Biotecnologia).

4.6.2. Testes de sensibilidade diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica do teste foi definida como o número de verdadeiros positivos (VP), dividido pela soma dos verdadeiros positivos e falsos negativos (FN), ou seja $\text{Sensibilidade} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN})$, de acordo com McAdam (2000). Estes resultados são tomados com base em conjuntos de linhagens com problemas de identificação.

4.6.3. Testes de especificidade analítica

Para testar a especificidade analítica dos ensaios de PCR, reações foram montadas utilizando **Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase** (Tabela 4), iniciadores de sequência específicos para a espécie a ser testada e DNA molde das outras espécies do complexo XSMA. Reações de controle foram realizadas acrescentando água ultrapura ao invés de DNA genômico e com *primers* para todas as espécies em questão. Os produtos da amplificação foram posteriormente visualizados em gel de agarose 1,5% descrito adiante em 4.6.1. A especificidade analítica do teste foi calculada com base no número de amplificações positivas dentro de um conjunto de amostras diferentes bem caracterizadas, dentro do mesmo teste.

4.6.4. Testes de especificidade diagnóstica

A especificidade diagnóstica do teste foi dada como proposto por McAdam (2000) e foi definida como o número de verdadeiros negativos (VN) dividido pela soma de verdadeiros negativos e falso positivos (FP), ou seja, Especificidade = $VN / (VN + FP)$. Os valores foram tomados com base na identificação de isolados clínicos e os critérios utilizados são os mesmos descritos no item 4.6.3.

4.6.5. Estabelecimento de concordância diagnóstica

Para calcular a concordância diagnóstica do teste, dada em porcentagem, foi dada pela soma de resultados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, dividido pelo total de testes e multiplicado por 100. Ou seja: Concordância diagnóstica = $[(\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Verdadeiros Negativos}) / \text{Total}] \times 100$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Sequenciamento e anotação funcional dos genomas

Diversos estudos têm tentado ao longo dos anos resolver o problema de identificação de corinebactérias patogênicas emergentes e tem sido cada vez mais demonstrado que as abordagens moleculares são as mais eficientes quando se trata de correta identificação de corinebactérias (ALIBI, 2015; BERNARD, 2012). A disponibilidade de sequências de genomas completos fornece agora a oportunidade de desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular através da detecção de genes-alvo espécie específicos para identificação de isolados, através da genômica comparativa.

No início deste trabalho, a única espécie do complexo XSMA que já havia sido sequenciada era a *C. amycolatum* SK46, isolada do Human Microbiome Project, cujo genoma já havia sido depositado no banco de dados do NCBI. Para a aplicação da estratégia aqui utilizada, foram sequenciadas outras três linhagens: *C. striatum* 1961 BR-RJ/09, que havia sido isolada da urina de uma mulher hospitalizada (SOUZA et al, 2015), *C. minutissimum* 1941, isolada de um paciente hospitalizado com câncer, isolada em um hospital no Rio de Janeiro, Brasil (MARTINS et al, 2009), e *C. xerosis* ATCC 373^T, uma linhagem de referência para a espécie isolada da infecção de ouvido de uma criança (LEHMANN; NEUMANN, 1986).

Além da identificação pelo método comercial API CoryneTM, as linhagens sequenciadas neste trabalho foram identificadas previamente por grupos colaboradores pelo método de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF usando o sistema de identificação Bruker Biotyper v.2.0 e foram obtidas identificações confiáveis (score > 2.0) em nível de espécie, mesmo daquelas identificadas apenas como pertencentes ao complexo XSMA nos testes bioquímicos. Ainda, após o sequenciamento genômico, foi realizada também análise dos genes *16S rDNA* e *rpoB* dos isolados, ambos usados como referência para identificação de espécies do gênero *Corynebacterium spp.* Os resultados confirmaram as identificações obtidas por MALDI-TOF, com todas as linhagens apresentando identidade maior que 98,0% com sequências gênicas de referência depositadas em bancos de dados, tais como o 16S

ribossomal RNA database do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Dados não publicados).

As descrições de genomas de corinebactérias feitas até o ano de 2012 apontaram o tamanho variável de sequências entre aproximadamente 2,4 Mb para *C. urealyticum* e 3,3 Mb para *C. glutamicum*, bem como conteúdos de G+C, que em geral são altos, mas que podem variar de 46% a 74% dos nucleotídeos totais (Bergey's Manual, 2012). Neste trabalho os genomas sequenciados variaram de 2,61 Mb para *C. striatum* 1961 a 2,78 Mb para *C. minutissimum* 1941, sendo maiores do que os genomas já descritos, maiores inclusive do que novos genomas sequenciados de outras linhagens da mesma espécie. No entanto, ao que se refere ao conteúdo de G+C, a porcentagem variou de 59,4% para *C. striatum* 1961 a 68,7% para *C. xerosis*.

As informações genômicas encontradas para as linhagens de corinebactérias utilizadas neste estudo estão contidas na Tabela 6. As informações genômicas de outras corinebactérias do complexo XSMA sequenciadas em outros estudos estão na Tabela 7.

Tabela 6 - Informações genômicas de corinebactérias do complexo XSMA utilizadas neste estudo

Espécie/Linhagem	Tamanho do genoma	Conteúdo G+C	Número de Genes	Número de RNAs Preditos	Referência
<i>C. xerosis</i> 373 ^T	2,75 Mb	68,7%	2613	56	PACHECO et al, 2015
<i>C. striatum</i> 1961	2,61 Mb	59,4%	2455	68	MATTOS-GUARALDI et al, 2015
<i>C. minutissimum</i> 1941	2,78 Mb	61,1%	2547	64	PACHECO et al, 2015
<i>C. amycolatum</i> SK46	2,51 Mb	58,6%	2167	51	Human Microbiome Project, ID 0282, BioProject PRJNA31007

Tabela 7 - Informações genômicas de outras corinebactérias do complexo XSMA disponíveis até o momento

Espécie/Linhagem	Tamanho do genoma	Conteúdo G+C	Número de Genes	Número de RNAs	Referência
<i>C. striatum</i> ATCC 6940	2,83 Mb	59,4%	2574	49	BioProject PRJNA31449
<i>C. minutissimum</i> ATCC 23348	2,66 Mb	59,96%	2436	58	PENTON et al, 2015

A anotação dos genomas foi feita através do servidor RAST (Aziz et al, 2008), um serviço automatizado de anotação de genomas bacterianos baseado na utilização de uma biblioteca de atividades funcionais curada manualmente, chamadas de subsistemas, e em famílias de proteínas em grande parte derivadas destes subsistemas. Este servidor possui uma interface intuitiva e permite a submissão de genomas mesmo com vários contigs, como neste estudo, sendo esta uma das principais razões de sua escolha.

O sequenciamento genômico das linhagens *C. striatum* 1961 BR-RJ/09, *C. minutissimum* 1941 e *C. xerosis* ATCC 373^T forneceu informações estruturais sobre tamanho dos genomas e conteúdos de G+C, enquanto que informações adicionais foram fornecidas pela anotação dos genomas usando RAST (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*), como número de sequências codificadoras. *C. amycolatum* SK46, cujo genoma já estava disponível publicamente em bancos de dados também foi incluída na nossa anotação genômica. Estes resultados estão compilados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados de sequenciamento e anotação genômica

Espécie	<i>C. xerosis</i> 373 ^T	<i>C. striatum</i> 1961 BR-RJ/09	<i>C. minutissimum</i> 1941	<i>C. amycolatum</i> SK46
Tamanho do genoma	2.749.912 pb	2.611.976 pb	2.780.059 pb	2.513.912 pb

Conteúdo G+C	68,7%	59,4%	61,1%	
Elementos funcionais	2669	2524	2611	2210
Possíveis genes perdidos	22	16	22	15
Genes incorporados	-	1	1	-
Sobreposição de mesma fita	-	1	1	-
Número de contigs	152	28	42	48
Número de subsistemas	340	350	354	330
Número de sequências codantes	2613	2456	2547	2159
Número de RNAs	56	68	64	51

5.2. Análise genômica comparativa

Em posse dos genomas completamente sequenciados e anotados, as análises comparativas foram feitas utilizando o servidor EDGAR (*Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios*) (Blom et al, 2009). O EDGAR é uma plataforma de comparação de genomas procaríotos e utiliza taxas de pontuações de BLAST. Estas pontuações são chamadas de SRVs (*Score Ratio Values*) e são definidas como a taxa de *score* observado dividido pelo *score* máximo, em valores que vão de 0 a 1 e que podem ser dados em porcentagem. Estes scores são valores de alinhamentos feitos por BLAST e dizem respeito à similaridade do alinhamento entre genes. Para o gênero *Corynebacterium spp.*, que o próprio servidor reconhece como um gênero de genomas muito distintos entre as espécies, o ponto

de corte para a distinção entre as sequências gênicas é definido com SVR de 35% (BLOM et al, 2009).

Ainda no EDGAR, uma análise de *singletons* foi feita e os identificadores das sequências gênicas foram utilizados para buscar suas respectivas sequências no NCBI, visto que o ponto de corte de 35% é muito rigoroso e alvos potenciais poderiam ter sido descartados na análise. Comparações de sequências completas feitas pelo servidor EDGAR entre as linhagens deste estudo permitiram a detecção de 972 sequências codificadoras (CDSs) comuns aos quatro isolados, tornando possível identificar também genes únicos para cada espécie, quando comparadas entre si: *C. xerosis* ATCC 373^T (1,057 CDSs), *C. striatum* ATCC 6940 (514 CDSs), *C. minutissimum* 1941 (623 CDSs) e *C. amycolatum* SK46 (517 CDSs) (Figura 2).

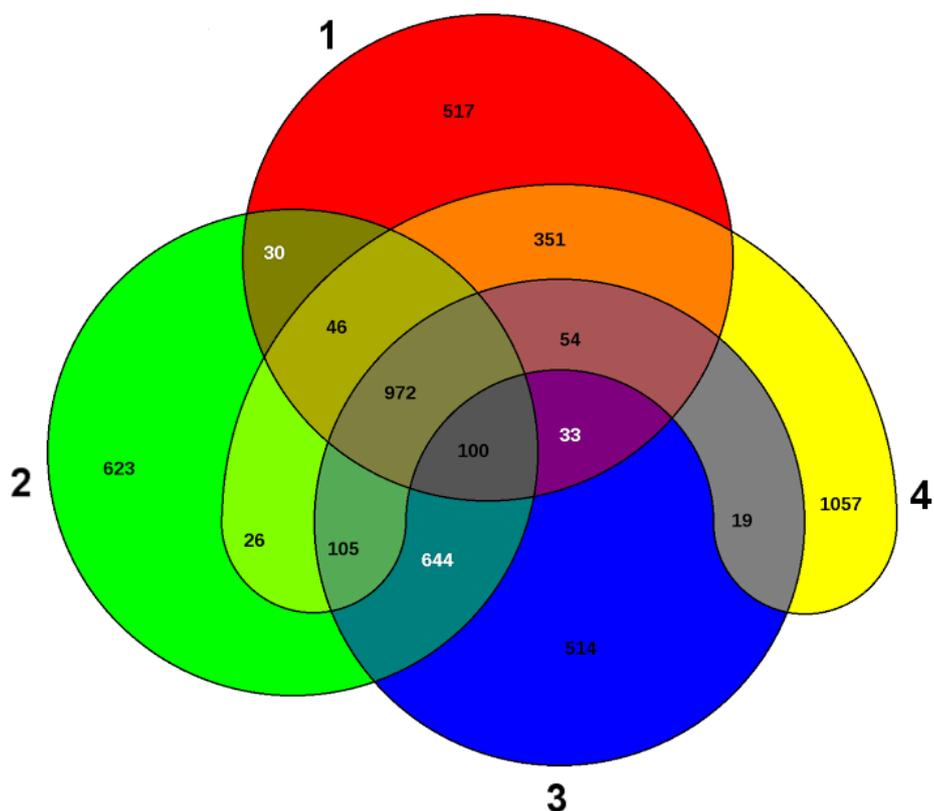


Figura 2 - Diagrama de Venn gerado a partir da análise genômica comparativa baseada em scores de BLAST e feita através do servidor EDGAR. Números de sequências codificadoras únicas e compartilhadas são mostradas. 1 (Vermelho): *C. amycolatum* SK46; 2 (Verde): *C. minutissimum* 1941; 3 (Azul): *C. striatum* ATCC 6940; 4 (Amarelo): *C. xerosis* ATCC 373^T. Esta análise levou em consideração todas as sequências codificadoras de cada genoma, e não apenas genes do *core* de cada espécie.

5.3. Ensaio de PCR

5.3.1. Padronização de PCR e resultados iniciais

A ideia inicial deste trabalho era incluir nas reações um alvo para marcação do gênero *Corynebacterium spp.* que funcionasse como um controle interno de amplificação. Assim, com a análise genômica comparativa foi possível ter acesso não só às sequências de genes únicos, mas também às sequências de genes comuns às quatro espécies do estudo. A análise genômica comparativa feita no EDGAR identificou 972 genes considerados comuns ao gênero (Figura 3), e após eliminação de genes hipotéticos e dos alinhamentos por BLASTn e BLASTx, o gene de uma provável esterase foi selecionado para compor o teste. Utilizando a sequência deste gene como entrada, o par de *primers* Cory-F e Cory-R foi desenhado e o tamanho esperado dos amplicons era de 513 pares de bases:

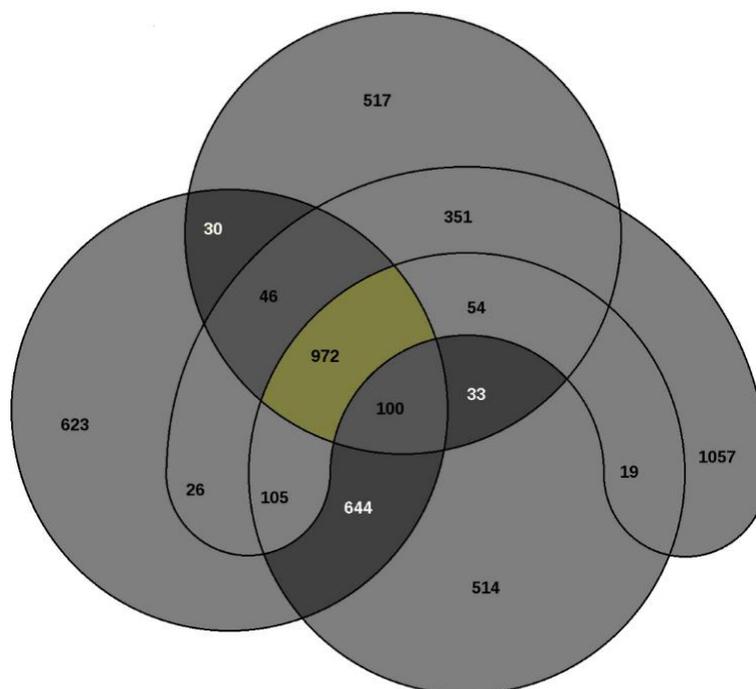


Figura 3 - Análise genômica comparativa para seleção de gene marcador para o gênero *Corynebacterium spp.* 972 genes foram encontrados através do EDGAR e estão mostrados na região em destaque.

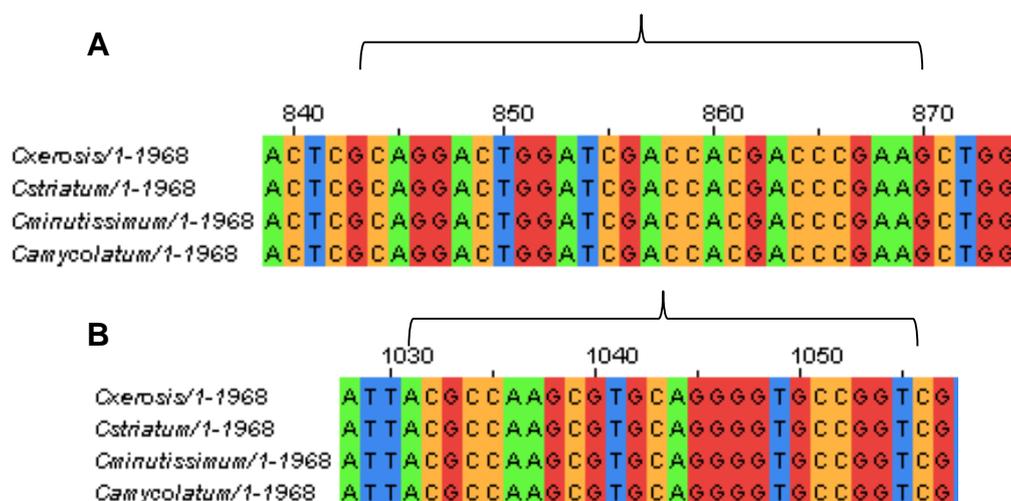


Figura 4 - Alinhamentos realizados para desenho de primers para marcação de gênero. Os alinhamentos foram feitos utilizando o ClustalO e visualizados no JalView. As chaves indicam a região utilizada para o desenho de *primers* direto (A) e reverso (B)

As reações de PCR foram testadas utilizando o sistema Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Tabela 4) e das tentativas de padronização de amplificação do par de *primers* marcadores de gênero, cujo produto de amplificação era esperado em todas as espécies, só houve amplificação em *C. striatum* 2454 e *C. minutissimum* 2422; não houve amplificação para *C. xerosis* ATCC 373^T nem para *C. amycolatum* 2459 (Figura 5).

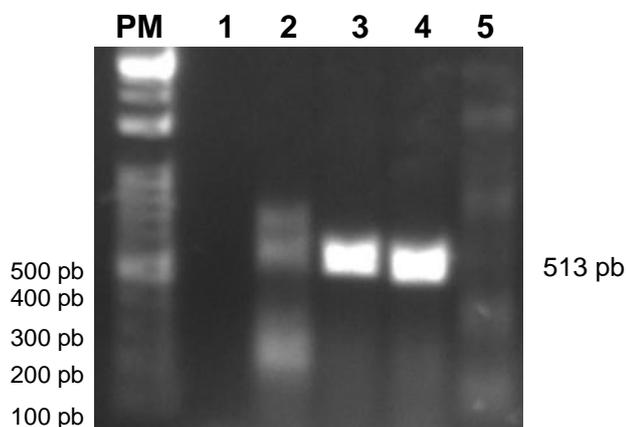


Figura 5 - Tentativa de padronização da reação de PCR para alvo marcador de gênero. Reações foram feitas utilizando o par de *primers* Cory-F e Cory-R e o sistema Platinun Taq®. PM – Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder, Promega); 1 – Controle negativo de reação; 2 – *C. xerosis* ATCC 373^T; 3 – *C. striatum* 2454; 4 - *C. minutissimum* 2422; 5 - *C. amycolatum* 2459. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

Ainda utilizando o sistema Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Tabela 4), as amplificações foram realizadas satisfatoriamente para os *primers*

espécie-específicos de *C. xerosis*, utilizando DNA genômico de *C. xerosis* ATCC 373^T; e para o *primer* de *C. striatum*, utilizando DNA genômico de *C. striatum* 2454 (Figura 6).

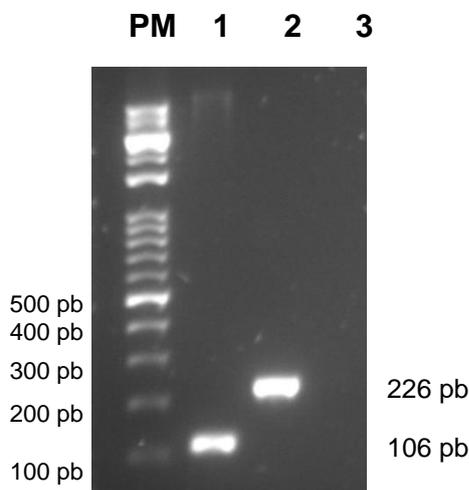


Figura 6 - Tentativa de padronização da reação de PCR para alvos espécie-específicos. Reações foram feitas utilizando pares de primers espécie-específicos e o sistema *Platinun Taq*®. PM – Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega); 1 – *C. xerosis* ATCC 373^T e primers Cxer-F e Cxer-R; 2 – *C. striatum* 2454 e primers Cstr—F e Cstr-R; 3 – Controle negativo de reação. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

Inicialmente foram testados também, por este sistema, os pares de *primers* Cmin-F1 e Cmin-R1 e C-min F2 e Cmin-R2 para identificação de *C. minutissimum* e o par Camy-F1 e Camy-R1 para identificação de *C. amycolatum*, no entanto, nenhuma amplificação ocorreu. Por se tratarem de genomas com altos conteúdos de G+C, optamos pela substituição do Kit de PCR pelo kit Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, que contém uma DNA Polimerase de alta especificidade e fidelidade, com maior eficiência para amplificação de alvos com alto conteúdo G+C. As primeiras reações foram realizadas utilizando as condições de ciclo de Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (1) (Tabela 4); no entanto houveram amplificações inespecíficas em todas as reações realizadas, que podem ser observadas na Figura 7.

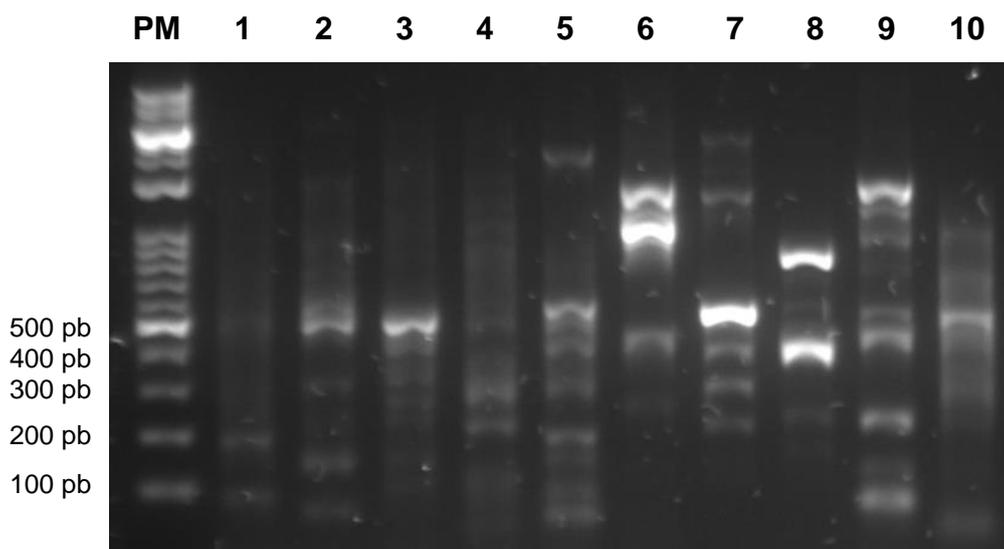


Figura 7 - Tentativa de padronização da reação de PCR utilizando Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (1). Reações foram feitas utilizando *primers* Cory-F e Cory-R nas colunas 1 a 5 e *primers* espécie-específicos nas demais colunas. PM – Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder); 1 – *C. xerosis* ATCC 373^T; 2 – *C. striatum* 2454; 3 - *C. minutissimum* 2422; 4 - *C. amycolatum* 2459; 5 – *C. diphtheriae* NCTC 13129; 6 – *C. minutissimum* 2422 e *primers* Cmin-F1 e Cmin-R1; 7 – *C. minutissimum* 2422 e *primers* Cmin-F2 e Cmin-R2; 8 – *C. amycolatum* 2459 e *primers* Camy-F e Camy-R; 9 – *C. minutissimum* 2422 e *primers* Cmin-F1 e Cmin-R2; 10 – Controle negativo de reação. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

Novas reações foram realizadas utilizando este kit com e sem o *Enhancer*, que teoricamente melhoraria a performance de ampliações para genomas com altos conteúdos de G+C. Apesar das tentativas, ainda assim os alvos de *C. minutissimum* e *C. amycolatum* continuaram sem amplificação. A partir deste ponto, novos pares de *primers* foram desenhados para estas duas espécies e os resultados foram discutidos nas seções de resultados específicos para cada espécie. Possivelmente estes mesmos resultados seriam obtidos sem substituição do kit de PCR.

O resumo de todas as PCRs realizadas neste estudo está compilado na Tabela 9.

Tabela 9 - Ensaio de PCR realizados

Linhagem	Cxer-F e Cxer-R	Cstr-F e Cstr-R	Cmin-F1 e Cmin-R1	Camy-F2 e Camy-R2
<i>C. xerosis</i> ATCC 373 ^T	+	-	-	-

<i>C. striatum</i> 2454	-	+	-	-
<i>C. striatum</i> 2103	NR	+	NR	-
<i>C. striatum</i> 2308	NR	+	NR	-
<i>C. striatum</i> 2324	NR	+	NR	-
<i>C. striatum</i> 2376	NR	+	NR	-
<i>C. striatum</i> 2390	NR	+	NR	-
<i>C. striatum</i> 2401	NR	+	NR	-
<i>C. striatum</i> 2432	NR	+	NR	-
<i>C. minutissimum</i> 2422	-	-	-	Amplificação inespecífica
<i>C. amycolatum</i> 2459	-	-	NR	+
<i>C. amycolatum</i> 2407	NR	-	NR	+
<i>C. amycolatum</i> 2354	NR	-	-	+

+ Amplificação positiva
- Amplificação negativa
NR Não realizado

5.3.2. Desenvolvimento de teste de identificação para *Corynebacterium xerosis*

5.3.2.1. Anotação genômica funcional

A anotação genômica funcional do genoma sequenciado de *C. xerosis* 373^T foi realizada também através do servidor RAST, permitindo a visualização de categorias funcionais através da distribuição de subsistemas. A predição evidenciou distribuição uniforme das categorias entre as espécies cujos genomas foram anotados, havendo predominância de funções relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas e carboidratos e cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e pigmentos. Também merecem destaque as funções biológicas relacionadas à patogenicidade e defesa (Figura 8).

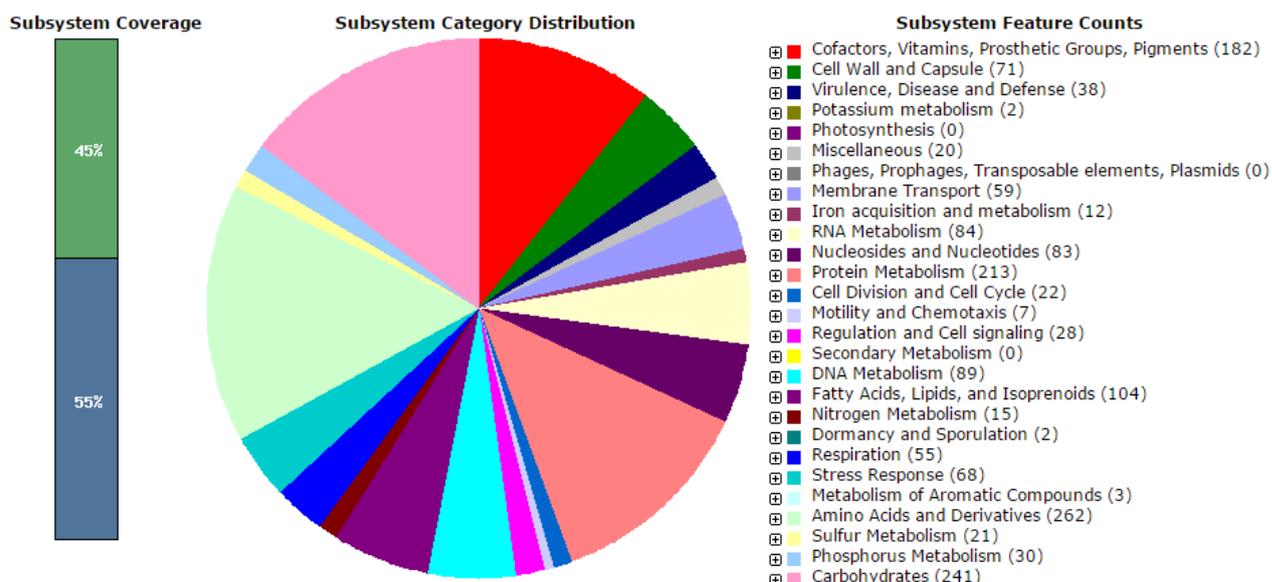


Figura 8 – Distribuição do genoma de *C. xerosis* 373^T em categorias funcionais. A distribuição de categorias funcionais foi obtida no ambiente SEED do RAST, utilizando a tecnologia de subsistemas baseados em FIGfams (AZIZ et al, 2008). Na coluna à esquerda, em verde, a porcentagem de genes alocados em subsistemas (45%), abaixo, em azul, a porcentagem de genes que não alocados em subsistemas (55%).

Cada subsistema é curado manualmente e definido como um conjunto de papéis funcionais e é alimentado através da conexão desses papéis funcionais a genes específicos em genomas específicos (AZIZ et al, 2008). Para *C. xerosis* 373^T, a maior parte dos subsistemas está relacionada a aminoácidos e derivados, metabolismo de proteínas e a carboidratos, além de grupos prostéticos.

5.3.2.2. Seleção de genes únicos e desenho de *primers*

A etapa inicial da seleção de genes únicos foi feita no EDGAR, através da análise genômica comparativa e obtenção de *singletons*. O servidor forneceu um total de 1057 genes únicos para *C. xerosis* utilizando parâmetros internos já discutidos anteriormente (Figura 9).

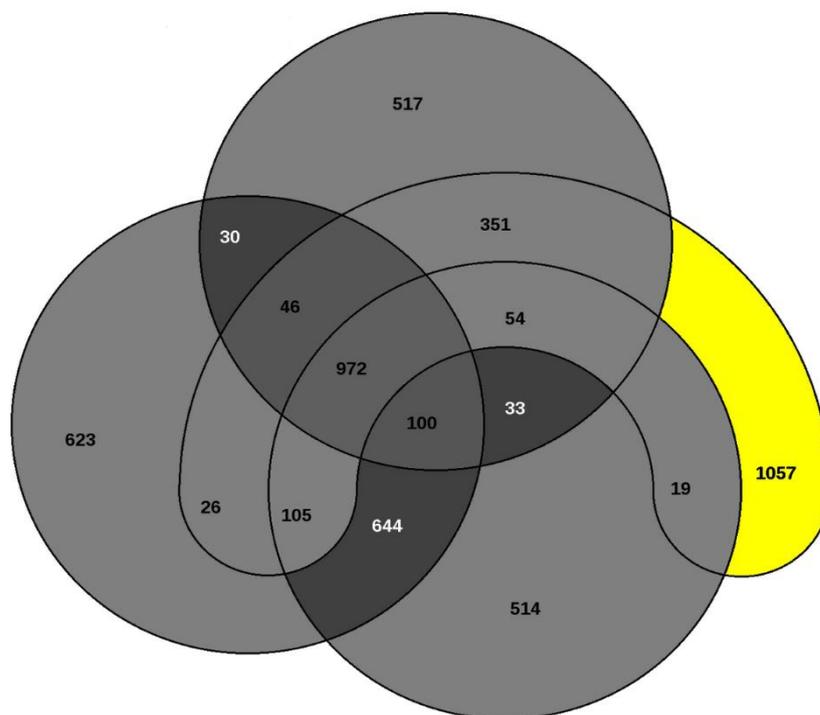


Figura 9 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de *C. xerosis*. 1057 genes únicos foram encontrados através do EDGAR e estão mostrados na região em amarelo.

A filtragem dos genes únicos encontrados pelo EDGAR permitiu a seleção de um gene único anotado correspondente à espécie *C. xerosis*, que codifica uma permease responsável pelo transporte de drogas e metabólitos da superfamília DMT. Resultados de alinhamentos não serão mostrados para esta espécie, visto que os alinhamentos por BLAST não encontraram nenhuma similaridade deste gene em outras bactérias do gênero *Corynebacterium spp.*

Utilizando a sequência encontrada para desenho de *primers* pela ferramenta *Primer-BLAST* (NCBI), o par de *primers* desenhado amplifica uma região de 106 pb e foi utilizado para todas as reações feitas para o desenvolvimento do teste de identificação de *C. xerosis*.

5.3.2.3. PCR diferencial

A amplificação do alvo de *C. xerosis* foi obtida utilizando os sistemas Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity e Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2)

(Tabela 4) sem alterações na qualidade da amplificação. O teste de especificidade analítica também foi realizado ao testar o par de *primers* de *C. xerosis* com o DNA genômico de linhagens de referência (Tabela 2) das outras espécies do complexo XSMA e seu resultado pode ser visualizado na Figura 10 a seguir. Houve uma fraca amplificação inespecífica do DNA genômico de *C. amycolatum*. No entanto, a banda de amplificação gerada corresponde a um peso molecular muito maior do que o esperado para esta reação e é quase imperceptível. Além disso, possivelmente esta amplificação não ocorra com a elevação da temperatura de anelamento dos *primers* na PCR e mesmo com este resultado, não há alteração do resultado de identificação.

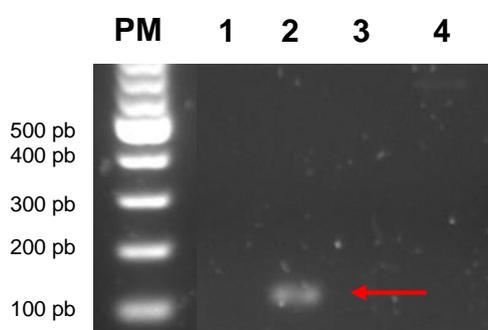


Figura 10 - Resultado do teste de especificidade analítica para *primers* de *C. xerosis*. PM: Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder, Promega); 1: Controle negativo de reação; 2: *C. xerosis*; 3: *C. striatum*; 4: *C. amycolatum*. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

5.3.3. Desenvolvimento de teste de identificação para *Corynebacterium striatum*

5.3.3.1. Anotação genômica funcional

A anotação genômica funcional do genoma sequenciado de *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 foi realizada também através do servidor RAST, permitindo a visualização de categorias funcionais através da distribuição de subsistemas. A predição evidenciou distribuição uniforme das categorias entre as espécies cujos genomas foram anotados, havendo predominância de funções relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas e carboidratos e cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e pigmentos (Figura 11).

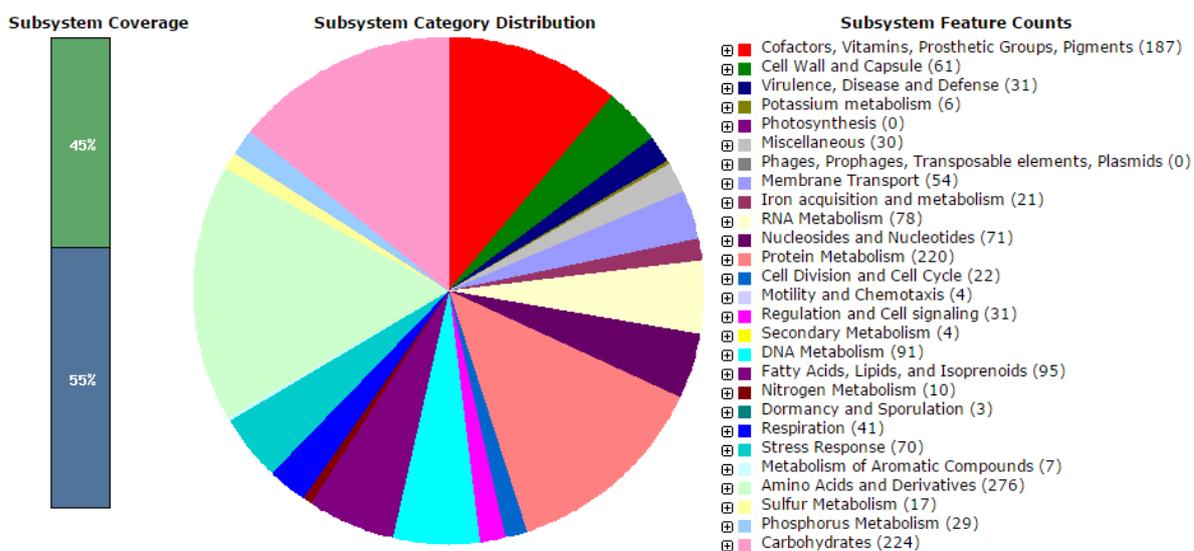


Figura 11 Distribuição do genoma de *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 em categorias funcionais. A distribuição de categorias funcionais foi obtida no ambiente SEED do RAST, utilizando a tecnologia de subsistemas baseados em FIGfams (AZIZ et al, 2008). Na coluna à esquerda, em verde, a porcentagem de genes alocados em subsistemas (45%), abaixo, em azul, a porcentagem de genes que não alocados em subsistemas (55%).

5.3.3.2. Seleção de genes únicos e desenho de *Primers*

A etapa inicial da seleção de genes únicos foi feita no EDGAR, através da análise genômica comparativa e obtenção de *singletons*. O servidor forneceu um total de 514 genes únicos para *C. striatum* utilizando parâmetros internos já discutidos anteriormente (Figura 12).

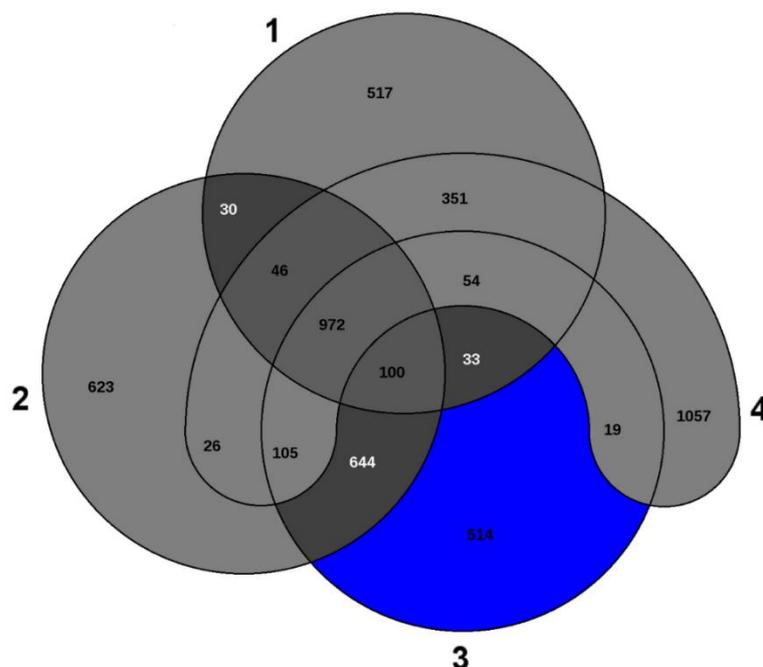


Figura 12 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de *C. striatum*. 514 genes únicos foram encontrados através do EDGAR e estão mostrados na região em azul.

Após a eliminação dos genes hipotéticos, 68 genes que possuíam anotação funcional foram submetidos ao BLASTn e BLASTx como descrito anteriormente e apenas o gene *EfeU*, que codifica para uma permease do transporte de ferro foi utilizado para o desenho de *primers* (Figura 13). Este gene possuía similaridade com o gene correspondente em outra coribebactéria, *C. massiliense*. Assim, para o desenho dos *primers*, foram utilizadas regiões com diferenças entre as sequências na posição final do *primer*, para garantir amplificação apenas do alvo específico. Sequências protéicas foram utilizadas em vez de sequências nucleotídicas por não terem sido encontradas sequências neste último banco de dados.

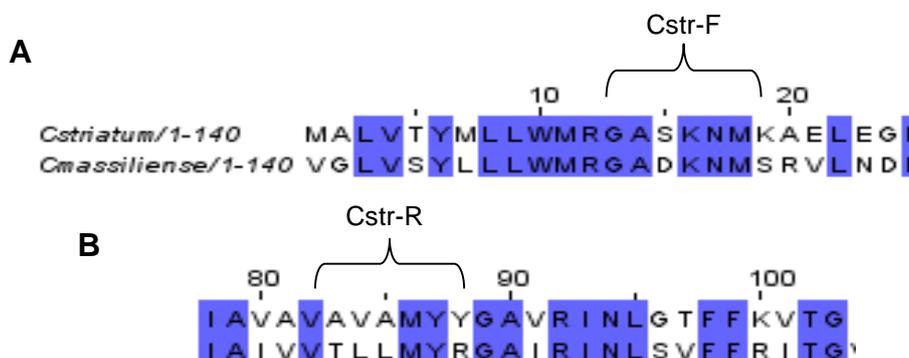


Figura 13 – Alinhamentos realizados para desenho de *primers* de *C. striatum*. Os alinhamentos foram feitos utilizando o ClustalO e visualizados no JalView. As chaves indicam a região dentro da proteína EfeU cuja sequência codificadora foi utilizada para desenho dos *primers* direto (A) e reverso (B).

Utilizando a sequência do gene *EfeU* de *C. striatum* para desenho de *primers* pela ferramenta *Primer-BLAST* (NCBI), o par de *Primers* desenhado amplifica uma região de 226 pb e foi utilizado para todas as reações feitas para o desenvolvimento do teste de identificação de *C. striatum*.

5.3.3.3. PCR diferencial

A amplificação do alvo de *C. striatum* foi obtida utilizando os sistemas Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity e Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2) (Tabela 4) sem alterações na qualidade da amplificação. O teste de especificidade analítica também foi realizado ao testar o par de *primers* de *C. striatum* com o DNA genômico de linhagens de referência (Tabela 2) das outras espécies do complexo XSMA e seu resultado pode ser visualizado na Figura 14 a seguir.

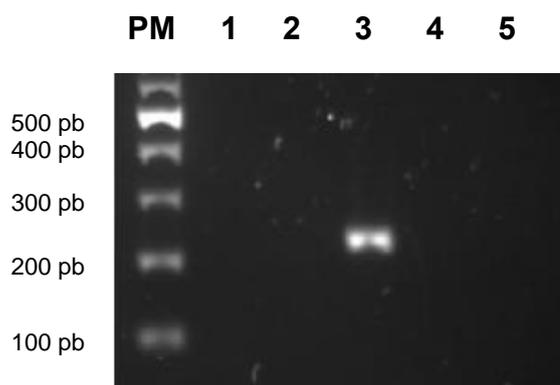


Figura 14 - Teste de especificidade analítica do ensaio de PCR para *C. striatum*. PM - Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega); 1 – Controle negativo de reação; 2 – *C. xerosis*; 3 - *C. striatum*; 4 - *C. minutissimum*; 5 – *C. amycolatum*. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

A reprodutibilidade do teste de *C. striatum* foi avaliada com a amplificação de oito linhagens diferentes da mesma espécie, nas condições do sistema Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2) utilizadas para o teste de especificidade analítica. Todas as oito reações foram positivas (Figura 15).

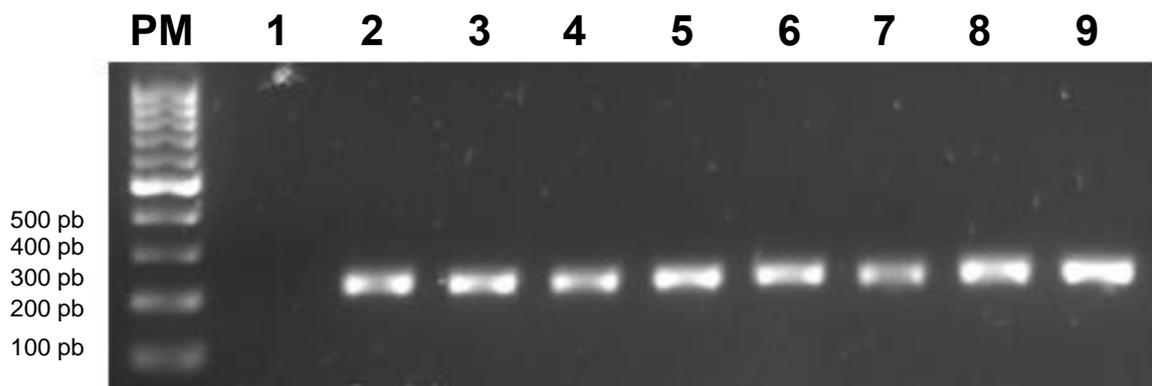


Figura 15 – Testes de reprodutibilidade de amplificação dos alvos de *C. striatum*. PM – Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega); 1 – Controle negativo de reação; 2 – *C. striatum* 2454; 3 – *C. striatum* 2103; 4 – *C. striatum* 2308; 5 – *C. striatum* 2324; 6 – *C. striatum* 2376; 7 – *C. striatum* 2390; 8 – *C. striatum* 2401; 9 – *C. striatum* 2432. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

Por se tratar de uma espécie que gera resultados de identificação ambíguos com *C. amycolatum*, a especificidade dos *primers* de *C. striatum* também foi testada utilizando DNA genômico das três linhagens de *C. amycolatum* e o sistema Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2). Todas as reações foram negativas (Figura 16). O resumo dos resultados de caracterização das linhagens testadas está apresentado nas Tabelas 10 e 11.

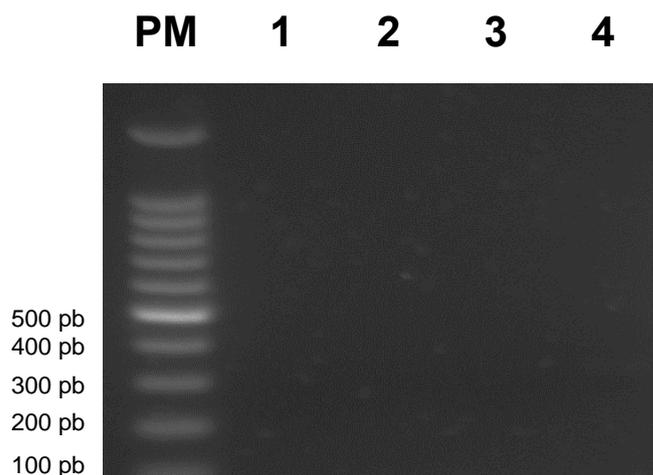


Figura 16 – Teste de especificidade analítica dos *primers* de *C. striatum* com amostras de *C. amycolatum*. PM – Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega); 1 – Controle negativo de reação; 2 – *C. amycolatum* 2354; 3 – *C. amycolatum* 2407; 4 – *C. amycolatum* 2459. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

Tabela 10 – Comparação entre os testes de identificação bioquímicos e identificação por PCR para *C. striatum*

Linhagens Testadas	API Coryne	Vitek 2	PCR para <i>C. striatum</i>
2103	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. striatum</i>	Positivo
2308	<i>C. striatum/C. amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	Positivo
2324	<i>C. afermentans/C. coyleae</i>	<i>C. minutissimum</i>	Positivo
2376	<i>C. macginleyi</i>	Não realizado	Positivo
2390	Não Realizado	<i>C. striatum</i>	Positivo
2401	Não Realizado	<i>C. striatum</i>	Positivo
2432	<i>C. striatum/C. amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	Positivo
2454	<i>C. striatum/C. amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	Positivo
2354	<i>Corynebacterium Grupo G</i>	<i>C. amycolatum</i>	Negativo
2407	<i>C. striatum/C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	Negativo
2459	<i>C. striatum/C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	Negativo

Os valores de especificidade e sensibilidade diagnóstica estão apresentados na Tabela 11, em relação aos testes bioquímicos e Tabela 13 em relação aos testes moleculares.

Tabela 11 – Valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação bioquímicos para *C. striatum*

Testes Bioquímicos (API + Vitek 2)			
PCR ESPECÍFICO	Positivos	Negativos	Especificidade
Positivos	5	3	50%
Negativos	0	3	
TOTAL	5	6	
Sensibilidade	100%		

Tabela 12 - Comparação entre os testes de identificação genotípicos e identificação por PCR para *C. striatum*

Linhagens Testadas	16S rRNA + rpoB	PCR para <i>C. striatum</i>
2103	<i>C. striatum</i>	Positivo
2308	<i>C. striatum</i>	Positivo
2324	<i>C. striatum</i>	Positivo
2376	<i>C. striatum</i>	Positivo

2390	<i>C. striatum</i>	Positivo
2401	<i>C. striatum</i>	Positivo
2432	<i>C. striatum</i>	Positivo
2454	<i>C. striatum</i>	Positivo
2354	<i>C. amycolatum</i>	Negativo
2407	<i>C. amycolatum</i>	Negativo
2459	<i>C. amycolatum</i>	Negativo

Tabela 13 - Valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação genotípicos para *C. striatum*

16S rRNA + rpoB			
PCR ESPECÍFICO	Positivos	Negativos	Especificidade
Positivos	8	0	100%
Negativos	0	3	
TOTAL	8	3	
Sensibilidade	100%		

Os valores de concordância diagnóstica também foram estabelecidos em relação aos testes bioquímicos (72% de concordância) e em relação aos testes genotípicos (100% de concordância). O valor mais baixo de concordância diagnóstica em relação aos testes bioquímicos não se deve à problemas de identificação do teste de PCR desenvolvido, e sim ao fato de que os testes bioquímicos sabidamente apresentam diversos erros nas identificações realizadas.

5.3.4. Desenvolvimento de teste de identificação para *Corynebacterium minutissimum*

5.3.4.1. Anotação genômica funcional

A predição gênica do genoma sequenciado de *C. minutissimum* 1941 evidenciou distribuição uniforme das categorias funcionais, havendo predominância de funções relacionadas carboidratos, aminoácidos e derivados (Figura 17).

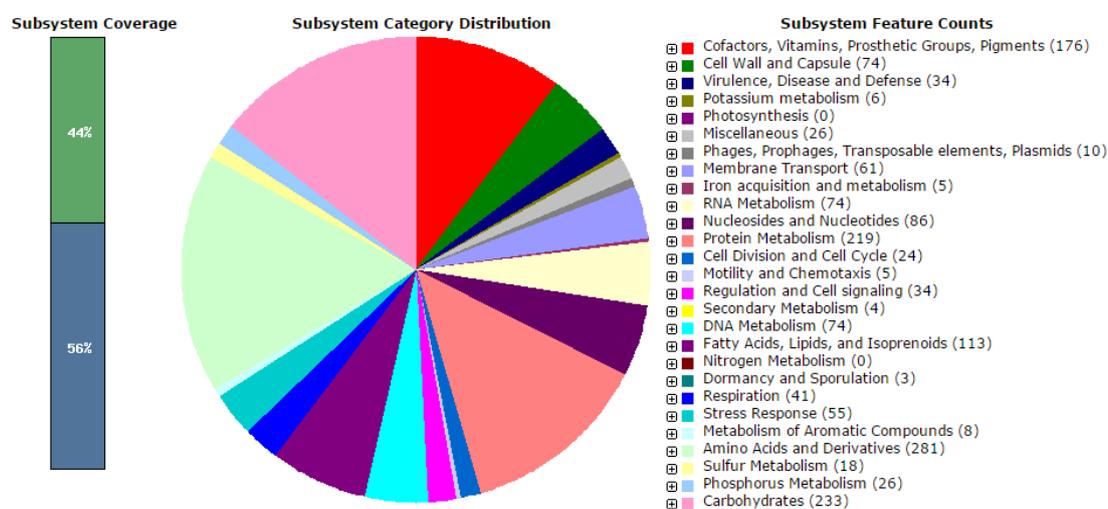


Figura 17 - Distribuição do genoma de *C. minutissimum* 1941 em categorias funcionais. A distribuição de categorias funcionais foi obtida no ambiente SEED do RAST, utilizando a tecnologia de subsistemas baseados em FIGfams (AZIZ et al, 2008). Na coluna à esquerda, em verde, a porcentagem de genes alocados em subsistemas (44%), abaixo, em azul, a porcentagem de genes que não alocados em subsistemas (56%).

5.3.4.2. Seleção de genes únicos e desenho de *primers*

A etapa inicial da seleção de genes únicos foi feita no EDGAR, através da análise genômica comparativa e obtenção de *singletons*. O servidor forneceu um total

de 623 genes únicos para *C. minutissimum* utilizando parâmetros internos já discutidos anteriormente (Figura 18).

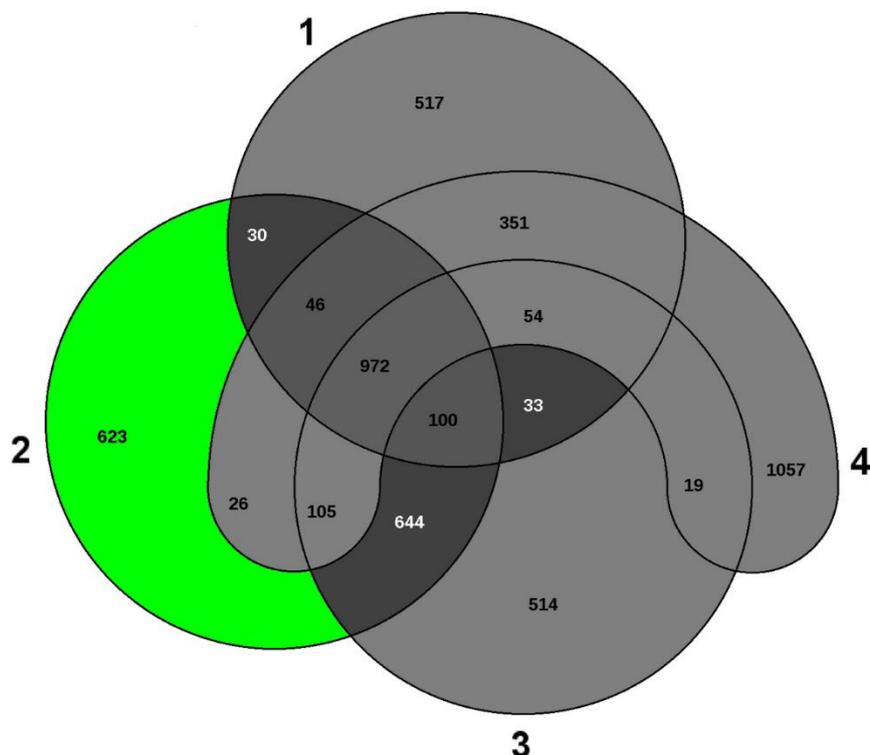


Figura 18 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de *C. minutissimum*. 623 genes únicos foram encontrados através do EDGAR e estão mostrados na região em verde.

Após a eliminação dos genes hipotéticos, genes que possuíam anotação funcional e estavam nos bancos de dados do NCBI foram submetidos ao BLASTn e BLASTx como descrito anteriormente, mas nenhum gene correspondente foi encontrado em corinebactérias. Uma reanotação funcional foi realizada no ambiente SEED do RAST e o gene da proteína RbsA, do sistema de transporte de ribose ABC foi utilizado para o desenho do par de *primers* Cmin-F3 e Cmin-R3. O gene da proteína RbsB, também do mesmo sistema de transporte foi selecionado para o desenho do par de *Primers* Cmin-F4 e Cmin-R4. Os alinhamentos referentes aos pares de *primers* para esta espécie não estão representados por não terem sido encontrados genes similares em outras corinebactérias de importância para este estudo.

5.3.4.3. PCR diferencial

A tentativa de amplificação dos alvos de *C. minutissimum* foi realizada utilizando os sistemas Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity e Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2), testando todos os pares de *primers* desenhados para a espécie, mas nenhuma das amplificações esperadas ocorreu para a espécie. Ao ter acesso aos resultados de caracterização da linhagem 2422, recebida como *C. minutissimum*, foi possível verificar que todos os testes de identificação realizados geraram resultados diferentes. Esta linhagem foi identificada como *C. striatum/amycolatum* pelo API Coryne™, como *C. singulare* pelo sequenciamento do gene *16S rRNA* (99,02% de identidade) e como *C. minutissimum* pelo sequenciamento do gene *rpoB* (97,83% de identidade). Provavelmente trate-se de outra corinebactéria que não do complexo XSMA, visto que não houve amplificação específica testando *primers* de outras espécies do complexo. Vale a pena ressaltar que esta linhagem é diferente da linhagem utilizada para realizar o sequenciamento e que o teste molecular não foi testado para a linhagem sequenciada por indisponibilidade de acesso ao DNA genômico desta espécie durante a realização de PCRs.

Os diferentes resultados de identificação para a linhagem de *C. minutissimum* 2422 se tornam uma evidência maior do problema de identificação desta espécie. Estudos como o de Suwantararat e colaboradores (2016) relatam este problema de identificação e demonstram a impossibilidade de distinguir *C. minutissimum* de uma outra espécie, *C. aurimucosum*, através de metodologias de referência, como sequenciamento do gene *16S rRNA* e por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Além disso, *C. aurimucosum* não está presente nos bancos de dados do API Coryne™. Este mesmo estudo sugere que bancos de dados de identificação destas espécies por MALDI-TOF tenham sido contruídos com linhagens identificadas incorretamente e até mesmo que estas duas espécies sejam, na verdade, uma só (SUWANTARAT et al, 2016). Não é possível sugerir a qual espécie a linhagem 2422 corresponde, no entanto, a correta identificação desta linhagem pode vir a ser de grande utilidade em estudos futuros do nosso grupo.

5.3.5. Desenvolvimento de teste de identificação para *Corynebacterium amycolatum*

5.3.5.1. Anotação genômica funcional

A predição gênica do genoma de *C. amycolatum* SK46 evidenciou distribuição uniforme das categorias funcionais, havendo predominância de funções relacionadas a carboidratos, aminoácidos e derivados e de grupos prostéticos (Figura 19).

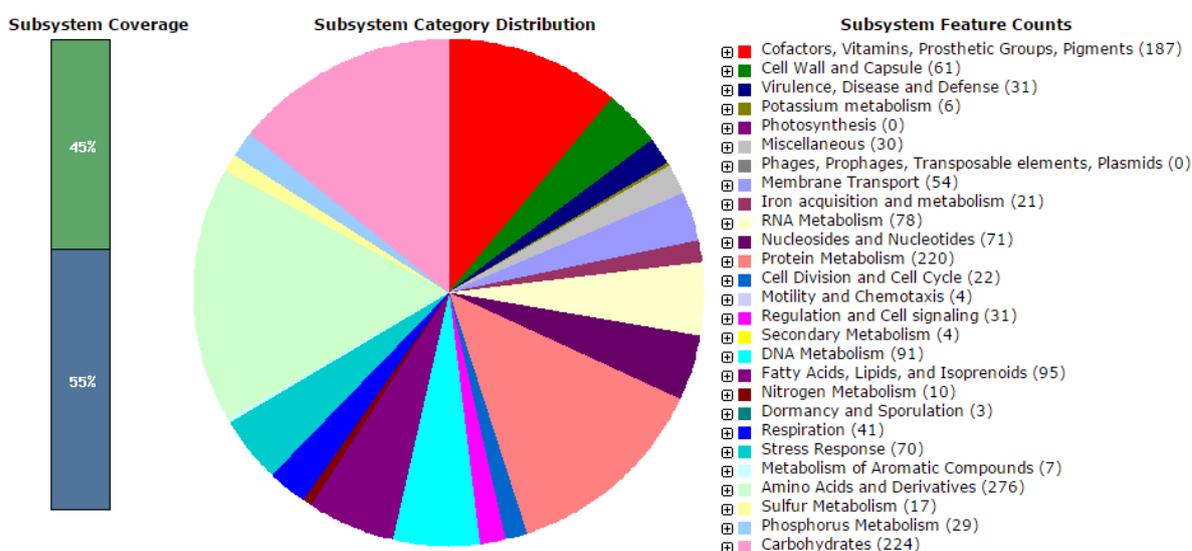


Figura 19 - Distribuição do genoma de *C. amycolatum* SK46 em categorias funcionais. A distribuição de categorias funcionais foi obtida no ambiente SEED do RAST, utilizando a tecnologia de subsistemas baseadas em FIGfams (AZIZ et al, 2008). Na coluna à esquerda, em verde, a porcentagem de genes alocados em subsistemas (45%), abaixo, em azul, a porcentagem de genes não alocados em subsistemas (55%).

5.3.5.2. Seleção de genes únicos e desenho de *primers*

A etapa inicial da seleção de genes únicos foi feita no EDGAR, através da análise genômica comparativa e obtenção de *singletons*. O servidor forneceu um total de 517 genes únicos para *C. amycolatum* utilizando parâmetros internos já discutidos anteriormente (Figura 20).

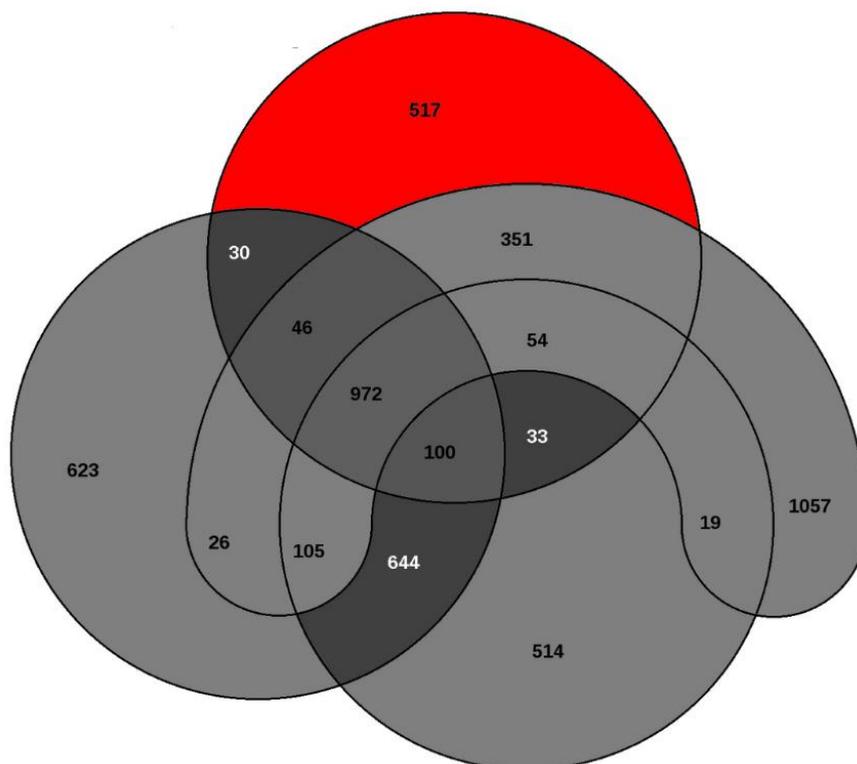


Figura 20 - Análise genômica comparativa para seleção de genes únicos de *C. amycolatum*. 517 genes únicos foram encontrados através do EDGAR e estão mostrados na região em vermelho.

Após a eliminação dos genes hipotéticos, genes que possuíam anotação funcional foram submetidos ao BLASTn e BLASTx como descrito anteriormente e apenas o gene que codifica para um provável componente da enterobactina sintetase foi utilizado para o desenho do par de *primers* Camy-F1 e Camy-R1. Uma reanotação foi feita no ambiente SEED do RAST e mais três genes foram encontrados para utilização como alvo: o gene da lisofosfolipase, que foi utilizado para desenho do par de *primers* Camy-F2 e Camy-R2; o gene da proteína de ligação de ATP do transportador de açúcares ABC, para o desenho do par Camy-F3 e Camy-R3 e do gene da maltose o-acetiltransferase, para o desenho do par de *primers* Camy-F4 e Camy-R4. Estes pares de *primers* foram utilizados para as reações feitas para o desenvolvimento do teste de identificação de *C. amycolatum*. Não existem alinhamentos para serem mostrados, pois não foi possível encontrar similaridade das sequências escolhidas com sequências de outras corinebactérias relevantes para o nosso estudo.

5.3.5.3. PCR diferencial

A amplificação do alvo de *C. amycolatum* não foi obtida nas reações iniciais utilizando o par de *primers* Camy-F1 e Camy-R1 utilizando os sistemas Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity e Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2) (Tabela 4). Assim, os outros três pares de *primers* desenhados para identificação desta espécie foram testados para avaliar quais amplificariam os alvos selecionados em todas as três linhagens de *C. amycolatum* disponíveis. Apenas o par de *primers* Camy-F2 e Camy-R2 foi capaz de amplificar o alvo em todas as linhagens testadas e foi utilizado para compor todos os testes de especificidade analítica deste trabalho utilizando o sistema Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2) descrito na Tabela 4 (Figura 21).

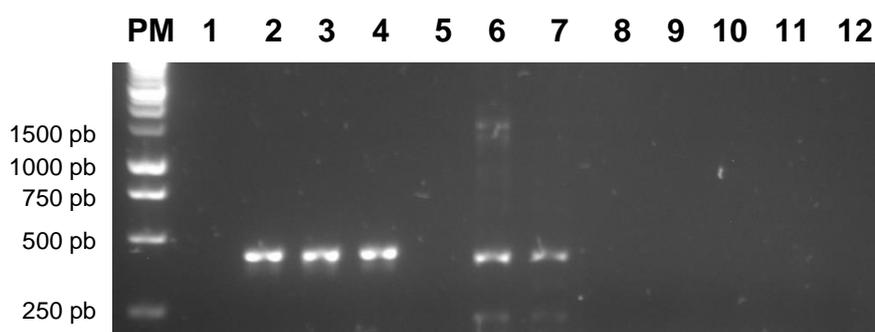


Figura 21 – Avaliação do desempenho de diferentes pares de *primers* para amplificação do alvo de *C. amycolatum*. PM – Marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder, Promega); 1 a 4: Par de *primers* C-amy F2 e C-amy R2. 1 – Controle negativo de reação; 2 – *C. amycolatum* 2459; 3 – *C. amycolatum* 2407; 4 – *C. amycolatum* 2354. 5 a 8: Par de *primers* C-amy F3 e C-amy R3. 5 – Controle negativo de reação; 6 – *C. amycolatum* 2459; 7 – *C. amycolatum* 2407; 8 – *C. amycolatum* 2354. 9 a 12 – Par de *primers* C-amy F4 e C-amy R4. 9 – *C. amycolatum* 2459; 10 – *C. amycolatum* 2407; 11 – *C. amycolatum* 2354. Tamanho dos amplicons: 1 a 4: 434 pb; 5 a 8: 402 pb e 9 a 12: 416 pb. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

O teste de especificidade analítica também foi realizado ao testar o par de *primers* Camy-F2 e Camy-R2 com o DNA genômico de linhagens de referência (Tabela 2) das outras espécies do complexo XSMA e seu resultado pode ser visualizado na Figura 22, a seguir, também utilizando o sistema Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (2). Neste teste, houve uma amplificação inespecífica para a linhagem de *C. minutissimum*. No entanto, a amplificação não corresponde ao peso molecular esperado e não compromete o resultado do teste.

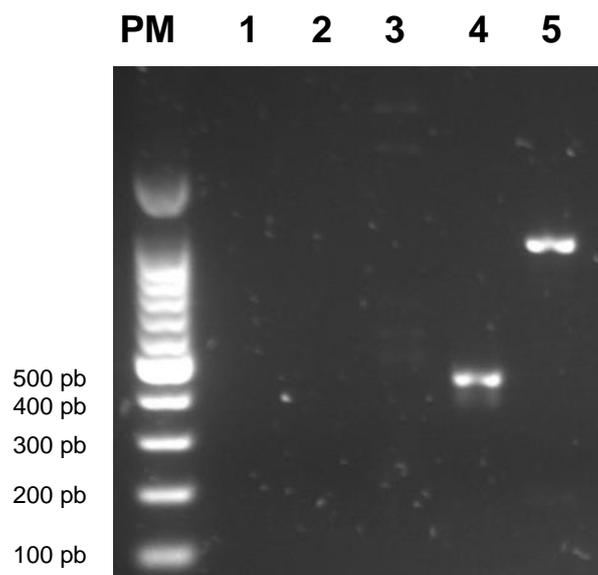


Figura 22 – Testes de especificidade analítica do ensaio de PCR para *C. amycolatum*. A: Primers Camy-F3 e Camy-R3. PM - Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega); 1 – Controle Negativo de Reação; 2 – *C. xerosis*; 3 – *C. striatum*; 4 - *C. amycolatum*; 5 – *C. minutissimum*. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

Por se tratar de uma espécie que gera resultados de identificação ambíguos com *C. striatum*, a especificidade dos primers de *C. amycolatum* foi testada utilizando DNA genômico das oito linhagens disponíveis de *C. striatum* (Figura 23). Todas as reações foram negativas, mas as linhagens *C. striatum* 2308, *C. striatum* 2401 e *C. striatum* 2432 apresentaram amplificações inespecíficas fracas em tamanhos de bandas maiores que o esperado, mesmo aumentando a temperatura de anelamento dos primers, conforme descrito no sistema Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (3) (Tabela 4). Estas amplificações inespecíficas, no entanto, não interferem no resultado final do teste. O resumo dos resultados de caracterização das linhagens de *C. amycolatum* testadas estão compilados na Tabela 14, para testes bioquímicos, e na Tabela 16 para identificação genotípica. Valores de especificidade e sensibilidade diagnóstica estão mostrados nas Tabelas 15 e 17.



Figura 23 – Testes de especificidade analítica dos primers de *C. amycolatum* com amostras de *C. striatum*. PM – Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Promega); 1 – Controle negativo de reação; 2 – *C. striatum* 2454; 3 – *C. striatum* 2103; 4 – *C. striatum* 2308; 5 – *C. striatum* 2324; 6 – *C. striatum* 2376; 7 – *C. striatum* 2390; 8 – *C. striatum* 2401; 9 – *C. striatum* 2390. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA gel stain.

Tabela 14 - Comparação entre os testes de identificação bioquímicos e identificação por PCR para *C. amycolatum*

Linhagens Testadas	API Coryne	Vitek 2	PCR para <i>C. amycolatum</i>
2354	Corynebacterium grupo G	<i>C. amycolatum</i>	Positivo
2407	<i>C. striatum</i> / <i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	Positivo
2459	<i>C. striatum</i> / <i>C. amycolatum</i>	<i>C. amycolatum</i>	Positivo
2103	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. striatum</i>	Negativo
2308	<i>C. striatum</i> / <i>C. amycolatum</i>	<i>C. minutissimum</i>	Negativo

2324	<i>C. afermentans/C. coyleae</i>	<i>C. minutissimum</i>	Indefinido
2376	<i>C. macginleyi</i>	Não realizado	Negativo
2390	Não Realizado	<i>C. striatum</i>	Negativo
2401	Não Realizado	<i>C. striatum</i>	Negativo
2432	<i>C. striatum/C. amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	Indefinido
2454	<i>C. striatum/C. amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	Indefinido

Tabela 15 - Valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação bioquímicos para *C. amycolatum*

Testes Bioquímicos (API + Vitek 2)				
PCR ESPECÍFICO	Positivos	Negativos	Indefinidos	Especificidade
Positivos	3	0	0	100%
Negativos	0	5	3	
TOTAL	3	5	3	
Sensibilidade	100%			

Tabela 16 - Comparação entre os testes de identificação genotípicos e identificação por PCR para *C. amycolatum*

Linhagens Testadas	16S rRNA + rpoB	PCR para <i>C. amycolatum</i>
2354	<i>C. amycolatum</i>	Positivo
2407	<i>C. amycolatum</i>	Positivo
2459	<i>C. amycolatum</i>	Positivo
2103	<i>C. striatum</i>	Negativo
2308	<i>C. striatum</i>	Negativo
2324	<i>C. striatum</i>	Indefinido
2376	<i>C. striatum</i>	Negativo
2390	<i>C. striatum</i>	Negativo
2401	<i>C. striatum</i>	Negativo
2432	<i>C. striatum</i>	Indefinido
2454	<i>C. striatum</i>	Indefinido

Tabela 17 - Valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica dos testes de PCR com relação aos testes de identificação bioquímicos para *C. amycolatum*

<i>16S rRNA + rpoB</i>				
PCR ESPECÍFICO	Positivos	Negativos	Indefinidos	Especificidade
Positivos	3	0	0	100%
Negativos	0	5	3	
TOTAL	3	5	3	
Sensibilidade	100%			

Os valores de concordância diagnóstica também foram estabelecidos em relação aos testes bioquímicos (100% de concordância) e em relação aos testes genotípicos (100% de concordância). Estes valores representam o ideal para um novo teste, no entanto é necessária a realização de validação externa do teste aqui desenvolvido, com painel ampliado de linhagens.

6. CONCLUSÕES

- A obtenção e o acesso a sequências genômicas completas, mesmo em versão de rascunho (*draft*), permitiu, através da análise genômica comparativa, a identificação de sequências codificadoras únicas entre as espécies estudadas, possibilitando a seleção de genes únicos marcadores de espécie em vez da utilização sequências de genes ortólogos que não discriminam bem corinebactérias;
- A anotação genômica semi-automatizada permite o reconhecimento de regiões gênicas no genoma sequenciado, mas ainda apresenta limitações em relação a banco de dados, sendo encontrados diversos possíveis genes, mas de função desconhecida, o que pode levar à perda de potenciais alvos para o diagnóstico molecular baseado em PCR;
- A identificação e amplificação de genes espécie-específicos resolveu o problema de ambiguidade entre *C. striatum* e *C. amycolatum* que costuma ser gerado com identificações feitas pelo API Coryne™;
- A PCR convencional é uma técnica de execução relativamente simples e pode reduzir o tempo de obtenção dos resultados de identificação de corinebactérias a poucas horas;
- Mesmo com a obtenção de resultados promissores, ainda se faz necessária a validação externa do teste com um painel ampliado de amostras teste, bem como validação clínica em situações reais de laboratórios de microbiologia clínica.

7. REFERÊNCIAS

ADDERSON, E. E.; BOUDREAU, J. W.; CUMMINGS, J. R.; POUNDS, S.; WILSON, D. A.; PROCOP, G. W.; HAYDEN, R. T. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 921-927. 2008.

ALATOOM, A. A.; CAZANAVE, C. J.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; PATEL, R. Identification of Non-diphtheriae Corynebacterium by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 160-163. 2012.

ALIBI, S.; FERJANI, A.; GAILLOT, O.; MARZOUK, M.; COURCOL, R.; BOUKADIDA, J. Identification of clinically relevant Corynebacterium strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. **Pathologie Biologie**, v. 63, n. 4-5, p. 153-157. 2015.

ALIBI, S.; FERJANI, A.; MARZOUK, M.; BOUKADIDA, J. Identification of Clinical Corynebacterium striatum Strains by PCR-Restriction Analysis Using the RNA Polymerase β -subunit gene (rpoB). **Journal Bacteriology & Parasitology**, v. 6, n. 2. 2015.

ANÍA, B. J. Multiresistant *Corynebacterium xerosis* as a Cause of Pneumonia in a Patient with Acute Leukemia. **Clinical Infectious Diseases**. 1994.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**. 2008.

BANDERA, A.; GORI, A.; ROSSI, M. C.; ESPOSIT, A. D.; FERRARIO, G.; MARCHETTI, G.; TOCALLI, L.; FRANZETTI, F. A Case of Costochondral Abscess due to *Corynebacterium minutissimum* in an HIV-infected Patient. **Journal of Infection**, v. 41, n. 1, pp. 103-105. 2000.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A.; LESIN, V.; NIKOLENKO, S.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A.; PYSHKIN, A.; SIROTKIN, A.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M.; PEVZNER, P. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, p. 455-477. 2012.

BERGER, S. A.; GOREA, A.; STADLER, J.; DAN, M.; ZILBERMAN, M. Recurrent Breast Abscesses Caused by *Corynebacterium minutissimum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 6. 1984.

BERNARD, K. A. AND FUNKE, G. Corynebacterium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1-70. 2015.

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

BERNARD, K.; FUNKE, G. *Corynebacterium*. In: JOHN WILEY & SONS, LTD. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015.

BERNARD, K.; PACHECO, A. L. In Vitro Activity of 22 Antimicrobial Agents against *Corynebacterium* and *Microbacterium* Species Referred to the Canadian National Microbiology Laboratory. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 37, n. 23, p. 187-198. 2015.

BIOMERIEUX. Annual Report, 2013.

BIOMERIEUX. API, The references. API & ID 32: Identification Databases.

BITTAR, F.; CASSAGNE, C.; BOSDURE, E.; STREMLER, N.; DUBUS, J. C.; SARLES, J.; REYNAUD-GAUBERT, M.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1231-1236. 2010.

BITTAR, F.; CASSAGNE, C.; BOSDURE, E.; STREMLER, N.; DUBUS, J. C.; SARLES, J.; REYNAUD-GAUBERT, M.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Infection in Cystic Fibrosis Patients, France. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, n. 8, p. 1231-1236. 2010.

BLOM, J.; ALBAUM, S. P.; DOPPMEIER, D.; PÜHLER, A.; VORHÖLTER, F. J.; ZAKRZEWSKI, M.; GOESMANN, A. EDGAR: A software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 154, 2009.

CAMELLO, T. C. SOUZA, M. C.; MARTINS, C. A.; DAMASCO, P. V.; MARQUES, E. A.; PIMENTA, F. P.; PEREIRA, G. A.; HIRATA, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. **Lett Appl Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 458-464. 2009.

CAZANAZE, C.; GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E.; HANSSSEN, A. D.; PATEL, R. *Corynebacterium* Prosthetic Joint Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1518-1523. 2012.

CHEVREUX, B.; WETTER, T.; SUHAI, S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. **Proceedings of the German Conference on Bioinformatics**. 1999.

CONTZEN, M.; STING, R.; BLAZEY, B.; RAU, J. *Corynebacterium ulcerans* from diseased wild boars. **Zoonoses Public Health**, v. 58, n. 7, p. 479-488. 2011.

CORNELIUS, A. J.; GILPIN, B.; CARTER, P.; NICOL, C.; ON, S. L. Comparison of PCR binary typing (P-BIT), a new approach to epidemiological subtyping of *Campylobacter jejuni*, with serotyping, pulsed-field gel electrophoresis, and multilocus

sequence typing methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1533-1544. 2010.

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

DE ARRIBA, J. J.; BLANCH, J. J.; MATEOS, F.; MARTINEZ-ALFARO, E.; DOLERA, J. *Corynebacterium striatum* first reported case of prosthetic valve endocarditis. **Journal of Infectology**, v. 44, n. 3, p. 193. 2002.

DIAS, A. A.; SANTOS, L. S.; SABBADINI, P. S.; SANTOS, C. S.; SILVA JUNIOR, F. C.; NAPOLEÃO, F.; NAGAO, P. E.; VILLAS-BÔAS, M. H.; HIRATA JUNIOR, R.; GUARALDI, A. L. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1176-1191. 2011.

DÍEZ-AGUILAR, M.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; FERNÁNDEZ-OLMOS, A.; GUIADO, P.; DEL CAMPO, R.; QUEREDA, C.; CANTÓN, R.; MESEGUER, M. A. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 769-772. 2013.

DOMINGO, M. C.; FOURNIER, E.; MASSÉ, C.; CHAREST, H.; BERNARD, K.; CÔTÉ, J. C.; TREMBLAY, C. Draft Genome Sequences of Two Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Strains. **Genome Announcements**, v. 3. 2015.

FARFOUR, E.; LETO, J.; BARRITAU, M.; BARBERIS, C.; MEYER, J.; DAUPHIN, B.; LE GERN, A. S.; LEFLÈCHE, A.; BADELL, E.; GUISO, N.; LECLERCQ, A.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; RODRIGUEZ-NAVA, V.; BERGERON, E.; RAYMOND, J.; VIMONT, S.; BILLE, E.; CARBONELLE, E.; GUET-REVILLET, H.; LÉCUYER, H.; BERETTI, J. L.; VAY, C.; BERCHE, P.; FERRONI, A.; NASSIF, X.; JOIN-LAMBERT, O. Evaluation of the Andromas Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Aerobically Growing Gram-Positive Bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2702-2707. 2012.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. **The New England Journal of Medicine**. 2012.

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

FUNKE, G.; BERNARD, K. A. Coryneform Gram-Positive Rods. In: Murray, P. R. et al **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed. 2011.

FUNKE, G.; LAWSON, P. A.; BERNARD, K. A.; COLLINS, M. D. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1124-1128. 1996.

FUNKE, G.; RENAUD, F. N.; FRENEY, J.; RIEGEL, P. Multicenter Evaluation of the Updated and Extended API (RAPID) Coryne Database 2.0. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3122-3126. 1997.

FUNKE, G.; VON GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE, J. E.; BERNARD, K. A. Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, n. 1, p. 125-159. 1997.

GALASKA, A. The Changing Epidemiology of Diphtheria in the Vaccine Era. **The Journal of Infectious Diseases**. 2000.

GILJOHANN, D. A.; MIRKIN, C. A. Drivers of biodiagnostic development. **Nature**, v. 462, p. 461-464. 2009.

GOMES, D. L.; MARTINS, C. A.; FARIA, L. M.; SANTOS, L. S.; SANTOS, C. S.; SABBADINI, P. S.; SOUZA, M. C.; ALVES, G. B.; ROSA, A. C.; NAGAO, P. E.; PEREIRA, G. A.; HIRATA, R. JR.; MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1419-1427. 2009.

GOMILA, M.; RENOM, F.; GALLEGOS, M. C.; GARAU, M.; GUERRERO, D.; SOLIANO, J. B.; LALUCAT, J. 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.

HOMMEZ, J.; DEVRIESSE, L. A.; VANECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BUTAYE, P.; HAESBROUCK, F. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 954-957. 1999.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1934-1936. 2005.

KNOX, K. L.; HOLMES, A. H. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. **Emerging Infectious Diseases**. 2002.

KONRAD, R.; HÖRMANSDORFER, S.; SING, A. Possible human-to-human transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 8, pp. 768-771. 2015.

KÖSER, C. U.; ELLINGTON, E. J. P.; CARTWRIGHT, E. J. P.; GILLESPIE, S. H.; BROWN, N. M.; FARRINGTON, M.; HOLDEN, M. T. G.; DOUGAN, G.; BENTLEY, S. D.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J. Routine Use of Microbial Whole Genome Sequencing in Diagnostic and Public Health Microbiology. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8. 2012.

KRISH, G.; BEAVER, W.; SARUBBI, F.; VERGHESE, A. *Corynebacterium xerosis* as a Cause of Vertebral Osteomyelitis. **Journal of Clinical Microbiology**. 1989.

LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; HO, C.; WOO, P. C. Y. Gene amplification and sequencing for bacterial identification. **Methods in Microbiology**. 2015.

LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. Atlas und Grundriss der bakteriologie und Lehrbuch der speziellen Bakteriologischen Diagnostik. 1st ed. Munich, Germany. 1896.

LETEK, M.; ORDÓÑEZ, E.; FERNANDEZ-NATAL, I.; GIL, J. A.; MATEOS, L. M. Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential *divIVA* gene as a target. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, n. 2, p. 256-263. 2006.

LEVENTHAL, G. E.; HILL, A. L.; NOWAK, M. A.; BONHOEFFER, S. Evolution and emergence of infectious diseases in theoretical and real-world networks. **Nature Communications**, v.6. 2015.

LORTHOLARY, O.; BUU-HOI, A.; FAGON, J. Y.; PIERRE, J.; SLAMA, M.; GUTMANN, L.; ACAR, J. F. Mediastinitis Due to Multiply Resistant *Corynebacterium xerosis*. **Clinical Infectious Diseases**. 1993.

MAGIORAKOS, A.-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. 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, p. 268-281. 2012.

MARTIN, M. C.; MELON, O; CELADA, M. M.; ALVAREZ, J.; MENDEZ, F. J.; VAZQUEZ, F. Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. **J. Med. Clin.**, v. 52, p. 599-602. 2003.

MARTINS, C.; FARIA, L.; SOUZA, M.; CAMELLO, T.; VELASCO, E.; HIRATA, R. JR.; THULER, L.; MATTOS-GUARALDI, A. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 905-913. 2009.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; GUIMARÃES, L. C.; SANTOS, C. S.; VERAS, A. A. O.; CARNEIRO, A. R.; SOARES, S. C.; RAMOS, J. N.; SOUZA, C.; VIEIRA, V. V.; HIRATA, R. JR.; AZEVEDO, V.; PACHECO, L. G. C.; SILVA, A.; RAMOS, R. T. J. Draft Genome Sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09, a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the Urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, p. e00869–15. 2015.

MCADAM, A. J. Discrepant analysis: How can we test a test? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2027-2029. 2000.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. Emerging infections: a perpetual challenge. **Lancet Infectious Diseases**. 2008.

MORSE, S. S. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 1. 1995.

Mumcuoğlu, İ.; Hazirolan, G.; Kurşun, S.; Aksu, N. Evaluation of the *Corynebacterium striatum* isolated with increasing frequency in one of the training and research hospital. **Turk Hij Den Biyol Derg**, v. 72, n. 4, p. 281-288. 2015.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; J. DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42. 2014

PACHECO, L. G. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; SANTOS, C. S.; VERAS, A. A. O.; GUIMARÃES, L. C.; ABREU, V.; PEREIRA, F. L.; SOARES, S. C.; DORELLA, F. A.; CARVALHO, A. F.; LEAL, C. G.; FIGUEIREDO, H. C. P.; RAMOS, J. N.; VIEIRA, V. V.; FARFOUR, E.; GUIISO, N.; HIRATA, R. JR.; AZEVEDO, V.; SILVA, A.; RAMOS, R. T. J. 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.

PASCUAL, C.; LAWSON, P. A.; FARROW, J. A. E.; GIMENEZ, M. N.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on the 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v. 45, pp. 724–728. 1995.

PENTON, P. K.; TYAGI, E.; HUMRIGHOUSE, B. W.; MCQUISTON, J. R. Complete Genome Sequence of *Corynebacterium minutissimum*, an Opportunistic Pathogen and the Causative Agent of Erythrasma. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2. 2015.

PESSANHA, B.; FARB, A.; LWIN, T.; LLOYD, B.; VIRMANI, R. Infectious endocarditis due to *Corynebacterium xerosis*. **Cardiovascular Pathology**. 2003.

RACANIELLO, V. R. Emerging infectious diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 6. 2004.

RAMOS, J. N. Caracterização de estirpes sugestivas de corineobactérias isoladas de sítios intravenosos. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2014.

RAMOS, R. T.; CARNEIRO, A. R.; BAUMBACH, J.; AZEVEDO, V.; SCHNEIDER, M. P.; SILVA, A. Analysis of quality raw data of second generation sequencers with Quality Assessment Software. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 130. 2011.

RIZVI, M.; RIZVI, M. W.; SHAHEEN; SULTAN, A; KHAN, F.; SHUKLA, I.; MALIK A. Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical site infections in a tertiary care hospital of North India. **J Infect Public Health**. 2013.

RUFAEL, D. W.; COHN, S. E. Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 1054-1061. 1994.

RUPPA, M. E.; STILES, K. G.; TARANTOLO, S.; GOERING, R. V. Central Venous Catheter-Related *Corynebacterium minutissimum* Bacteremia. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 19, n. 10, pp. 786-788. 1998.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Review Microbiology**, v. 8, p. 74-82. 2010.

SCHULTHESS, B.; BLOEMBERG, G. V.; ZBINDEN, R.; BOTTGER, E. C.; HOMBACH, M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods - development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, 2014.

SOTO, A.; ZAPARDIEL, J.; SORIANO, F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, p. 756-759. 1994.

SOUZA, C.; FARIA, Y. V.; SANT'ANNA, L. O.; VIANA, V. G.; SEABRA, S. H.; SOUZA, M. C.; VIEIRA, V. V.; JÚNIOR, R. H.; MOREIRA, L. O.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 242-248. 2015.

SZEMRAJ, M.; KWASZEWSKA A.; PAWLAK, R.; SZEWCZYK, E. M. Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin B Resistance in Lipophilic Corynebacteria Inhabiting Healthy Human Skin. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 5, p. 404-409. 2014.

TARR, P. E.; STOCK, F.; COOKE, R. H.; FEDORKI, D. P.; LUCEY D. R. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumoniae in a heart transplant recipient. **Transpl. Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 53-58. 2003.

TEKIPPE, E. M.; THOMAS, B.S.; EWALD, G. A.; LAWRENCE, S.J.; BURNHAM, C. A. Rapid Emergence of Daptomycin Resistance in Clinical Isolates of *Corynebacterium striatum*... A Cautionary Tale. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v.33, n.12, p. 2199-2205. 2014.

VALENSTEIN, P.; KLEIN, A.; BALLOW, C.; GREENE, W. *Corynebacterium xerosis* septic arthritis. **American Journal of Clinical Pathology**. 1988.

VENEZIA, J.; CASSIDAY, P. K.; MARINI, R. P.; SHEN, Z.; BUCKLEY, E. M.; PETERS, Y.; TAYLOR, N.; DEWHIRST, F. E.; TONDELLA, M. L.; FOX J. G. Characterization of *Corynebacterium* species in macaques. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 1401-1408. 2012.

VENTURA, M.; CHANCHAYA, C.; TAUCH, A. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495-548. 2007.

VIGUETTI, S. Z.; PACHECO, L. G.; SANTOS, L. S.; SOARES, S. C.; BOLT, F.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G.; ROSSO, M. L.; GUIZO, N.; MIYOSHI, A.; HIRATA, R. JR.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; AZEVEDO, V. Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. **Epidemiol Infect.**, v. 140, n. 4, p. 617-620. 2012.

VILA, J.; JUIZ, P.; SALAS, C.; ALMELA, M.; DE LA FUENTE, C. G.; ZBOROMYRSKA, Y.; NAVAS, J.; BOSCH, J.; AGUERO, J.; DE LA BELLACASA, J. P.; MARTÍNEZ-

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

VOISIN, S.; DERUAZ, D.; FRENEY.; RENAUD, F. Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. striatum* and related species by pyrolysis-gas-liquid chromatography with atomic emission detection. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 5, pp. 307–311. 2002.

WAGNER, K. S.; WHITE, J. M.; LUCENKO, I.; MERCER, D.; CROWCROFT, N. S.; NEAL, S.; EFSTRATIOU, A. Diphtheria Surveillance Network. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. **Emerging Infectious Disease**, v. 18, n. 2, p. 217-225. 2012.

WESTBLADE, L. F. et al. Septic Arthritis of a Native Knee Joint Due to *Corynebacterium striatum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1786-1718. 2014.

WOLCOTT, R. D.; HANSON, J. D.; REES, E. J.; KOENIG, L. D.; PHILLIPS, C. D.; WOLCOTT, R. A.; COX, S. B.; WHITE, J. S. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. **Wound Repair and Regeneration**. 2015.

World Health Organization – WHO. Antimicrobial resistance. Fact sheet, n. 194, apr. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em 20 de dezembro de 2015.

ZASADA, A. A.; BACZEWSKA-REJ, M.; WARDAK, S. An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland--molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. **Int J Infect Dis.**, v. 14, n. 10, p. 907-912. 2010.



Draft Genome Sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09, a Multidrug-Susceptible Strain Isolated from the Urine of a Hospitalized 37-Year-Old Female Patient

Ana L. Mattos-Guaraldi,^a Luls C. Guimarães,^b Carolina S. Santos,^c Adonney A. O. Veras,^b Adriana R. Carneiro,^b Slomar C. Soares,^d Juliana N. Ramos,^{a,*} Cassius Souza,^a Veronica V. Vieira,^f Raphael Hirata, Jr.,^a Vasco Azevedo,^g Luls G. C. Pacheco,^c Artur Silva,^b Rommel T. J. Ramos^b

Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^a; Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil^b; Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil^c; Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Institute of Biological Sciences and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil^d; National Institute for Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation (NCCQS–Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^e; Instituto Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Foundation (IOC–Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^f; Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil^g

A.S. and R.T.J.R. contributed equally to this work.

***Corynebacterium striatum* commonly colonizes the normal skin and nasopharyngeal tract of humans; however, this potentially pathogenic bacterium has been identified as the causative agent of several nosocomial infections. The current study describes the draft genome of strain 1961 BR-RJ/09, isolated from the urine of a hospitalized patient from Brazil.**

Received 25 June 2015 Accepted 29 June 2015 Published 6 August 2015

Citation Mattos-Guaraldi AL, Guimarães LC, Santos CS, Veras AAO, Carneiro AR, Soares SC, Ramos JN, Souza C, Vieira VV, Hirata R, Jr, Azevedo V, Pacheco LGC, Silva A, Ramos JTJ. 2015. Draft genome sequence of *Corynebacterium striatum* 1961 BR-RJ/09, a multidrug-susceptible strain isolated from the urine of a hospitalized 37-year-old female patient. *Genome Announc* 3(4):e00869-15. doi: 10.1128/genomeA.00869-15.

Copyright © 2015 Mattos-Guaraldi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Ana L. Mattos-Guaraldi, aguaraldi@gmail.com, or Rommel T. J. Ramos, rommelthiago@gmail.com.

Corynebacterium striatum is a Gram-positive bacterium that belongs to the CMNR group, which includes species of the genera *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, and *Rhodococcus* (1). Pathogenic clones of *C. striatum*, mostly causing respiratory tract infections, have been identified in several nosocomial outbreaks reported in different countries (2–4). This microorganism has also been reported to be responsible for infections that include endocarditis, meningitis, and septic arthritis (2, 5). Many isolates of this emerging human pathogen already present a multidrug-resistant phenotype.

A recent study in Brazil (6) evaluated the antimicrobial susceptibility patterns of several *C. striatum* isolates recovered from hospitalized patients and, through pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, identified clones associated with outbreaks and with multidrug resistance. In this context, the *C. striatum* 1961 BR-RJ/09 strain (PFGE type III, multidrug susceptible) was isolated from the urine of a hospitalized 37-year-old woman from Rio de Janeiro, Brazil (6). Genomic DNA of this isolate was extracted using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen) protocol, and genome sequencing was performed using an Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) System with a 318 chip and fragment libraries. The quality of reads was analyzed using the software FastQC (<http://www.biotinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) and the *de novo* assembly was performed using MIRA v4.02 (7) and SPAdes v3.10 (8) assemblers, and curation to reduce the gaps was done with the Lasergene v11 Suite (DNASTar). The assembly produced 28 contigs with a total of 2,611,976 bp and 59.4% G+C content. The contigs were annotated using Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (9), which

identified 2,455 protein-encoding genes and 68 RNA genes. Among the annotated protein-encoding genes, a *narKHJ1* gene cluster was identified with high similarity to the *Corynebacterium diphtheriae* narKHJ1 operon, which is responsible for nitrate reductase (10), suggesting a similar anaerobic growth mechanism. This genome is part of an ongoing study of the comparative genomics, pathogenicity, and vaccine and drug targets of the species.

Nucleotide sequence accession number. This genome has been deposited in GenBank under the accession number [LAYR0000000](https://doi.org/10.1101/000000).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian Research Funding Agencies CNPq, CAPES (PROCAD 071/2013), and FAPESB (JCB0031/2013).

REFERENCES

- Dorella FA, Pacheco LG, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 37:201–218. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2005056>.
- Bato PV, Mota HF, Fretas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, Souza MC, Camello TC, Hirata Junior R, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL. 2013. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:23–29.
- Renom F, Gomila M, Garan M, Gallegos MD, Guerrero D, Lalucat J, Soriano JB. 2014. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New Microbes New Infect* 2:106–114. <http://dx.doi.org/10.1002/nmi2.48>.
- Verroken A, Bauratng C, Deplano A, Bogaerts P, Huang D, Wauters G, Glupczynski Y. 2014. Epidemiological investigation of a nosocomial out-

Short Research Communication

Draft Genome Sequences of Two Species of “Difficult-to-Identify” Human-Pathogenic Corynebacteria: Implications for Better Identification Tests

Luis G. C. Pacheco ^{1,✉}, Ana L. Mattos-Guaraldi ², Carolina S. Santos ¹, Adorney A. O. Veras ³, Luis C. Guimarães ^{3,4}, Vinicius Abreu ⁴, Felipe L. Pereira ⁵, Siomar C. Soares ⁵, Fernanda A. Dorella ⁵, Alex F. Carvalho ⁵, Carlos G. Leal ⁵, Henrique C. P. Figueiredo ⁵, Juliana N. Ramos ^{2,6}, Veronica V. Vieira ⁶, Eric Farfour ⁷, Nicole Guiso ⁷, Raphael Hirata Jr. ², Vasco Azevedo ⁴, Artur Silva ^{3,6}, Rommel T. J. Ramos ^{3,6,✉}

1. Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil.
2. Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
3. Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil.
4. Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.
5. National Reference Laboratory for Aquatic Animal Diseases, Ministry of Fisheries and Aquaculture, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.
6. National Institute for Quality Control in Health - Oswaldo Cruz Foundation (INCQS - Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
7. Unité de Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines, Institut Pasteur, Paris, France.

These authors share credit for senior authorship in this work.

✉ Corresponding authors: Tel.: + 55 71 3283-8940. E-mail: luis.pacheco@ufba.br (L. Pacheco) / rommelthiago@gmail.com (R.T. Ramos).

© 2015 IvySpring International Publisher. Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited. See <http://ivySpring.com/terms> for terms and conditions.

Published: 2015.08.01

Abstract

Non-diphtheriae *Corynebacterium* species have been increasingly recognized as the causative agents of infections in humans. Differential identification of these bacteria in the clinical microbiology laboratory by the most commonly used biochemical tests is challenging, and normally requires additional molecular methods. Herein, we present the annotated draft genome sequences of two isolates of “difficult-to-identify” human-pathogenic corynebacterial species: *C. xerosis* and *C. minutissimum*. The genome sequences of ca. 2.7 Mbp, with a mean number of 2,580 protein encoding genes, were also compared with the publicly available genome sequences of strains of *C. amycolatum* and *C. striatum*. These results will aid the exploration of novel biochemical reactions to improve existing identification tests as well as the development of more accurate molecular identification methods through detection of species-specific target genes for isolate’s identification or drug susceptibility profiling.

Key words: *Corynebacterium* spp., Emerging pathogens, Biochemical tests, Molecular identification

Non-diphtheriae *Corynebacteria* are usually found as constituents of the normal microbiota of the human skin and mucosae. However, several *Corynebacterium* species have been increasingly implicated as the causative agents of opportunistic and nosocomial infections in recent years. These emerging human pathogenic corynebacteria are often regarded as “dif-

ficult-to-identify” and multidrug resistance is a common finding among isolates of the most frequently recovered species (1-3).

Corynebacterium minutissimum, which is the causative agent of the chronic skin condition erythrasma, has emerged in recent years as an important causative agent of invasive infections and of surgical

site infections, both in immunocompromised patients and in immunocompetent individuals (1, 4). The species *Corynebacterium xerosis* is also a frequently reported human pathogen, with isolates being identified in cases that include ear infections, brain abscesses and osteomyelitis (2). This latter species is of particular interest due to the zoonotic potential and due to the difficulties associated to identification of this microorganism in the clinical microbiology laboratory by the most traditionally employed tests (1, 2, 5, 6).

In this report, we announce the draft genome sequences of two isolates of emerging human pathogenic *Corynebacterium* species, namely: (i) *C. minutissimum* 1941, isolated from an hospitalized cancer patient (1); and (ii) *C. xerosis* ATCC 373^T, a type strain of the species that was isolated from the ear discharge of a child. At the time of preparation of this work, no other genome assembly was publicly available for the species *C. xerosis*.

Both isolates rendered identification scores higher than 2.0 when analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using MALDI-Biotyper v.2.0 software, as described previously (7). Analysis of 16S ribosomal RNA was also concordant with identifications obtained by MALDI-TOF MS and by conventional biochemical methods.

Genomic DNA of the isolates was extracted using the QIAamp DNA minikit (Qiagen) protocol and

DNA sequencing was performed with the 318 chip of the Ion Torrent PGM platform (Life Technologies), using fragment libraries. *De novo* assembly of the sequences into contigs was achieved using MIRA (8) and SPAdes (9) assemblers, and curation to reduce the gaps was done with the Lasergene v.11 Suite (DNASTAR). Sequence assembly produced a total of 42 contigs for *C. minutissimum* 1941 and 152 contigs for *C. xerosis* ATCC 373^T. The draft genome sequence of the former species had an estimated length of 2,780,059, with a G+C content of 61.1%. The latter species showed an estimated genome size of 2,749,912, with a G+C content of 68.7%. Automatic annotation using the RAST server (10) allowed for identification of 2,547 protein encoding genes (PEGs) and 64 RNA genes in the *C. minutissimum* 1941 genome; the number of PEGs in the *C. xerosis* ATCC 373^T genome was 2,613, with 56 RNA genes.

The availability of these whole genome sequences now provides the opportunity to evaluate novel biochemical reactions to improve identification tests currently used in clinical microbiology laboratories. We used the SEED annotation environment (<http://www.theseed.org/>) to investigate the genomic basis for some typical biochemical features commonly used to differentiate these "difficult-to-identify" corynebacterial species. We also included in these comparisons the publicly available genomic sequences for *C. striatum* ATCC 6940 (ACGE00000000) and *C. amycolatum* SK46 (NZ_ABZU00000000); this latter species frequently generates ambiguous identifications mostly with *C. xerosis* and *C. striatum*. The absence of genes coding for enzymes involved in maltose utilization, such as maltose phosphorylase (EC 2.4.1.8), was a distinctive characteristic of *C. striatum* ATCC 6940 in comparison to the other species. On the other hand, potential activity of respiratory nitrate reductase (EC 1.7.99.4) was only detected in this isolate along with *C. xerosis* ATCC 373^T, but not in *C. amycolatum* SK46 or *C. minutissimum* 1941. Additionally, potential for galactose uptake and utilization was also not detected in *C. minutissimum* 1941.

Furthermore, whole genome sequencing may also aid development of more accurate molecular diagnostic methods through

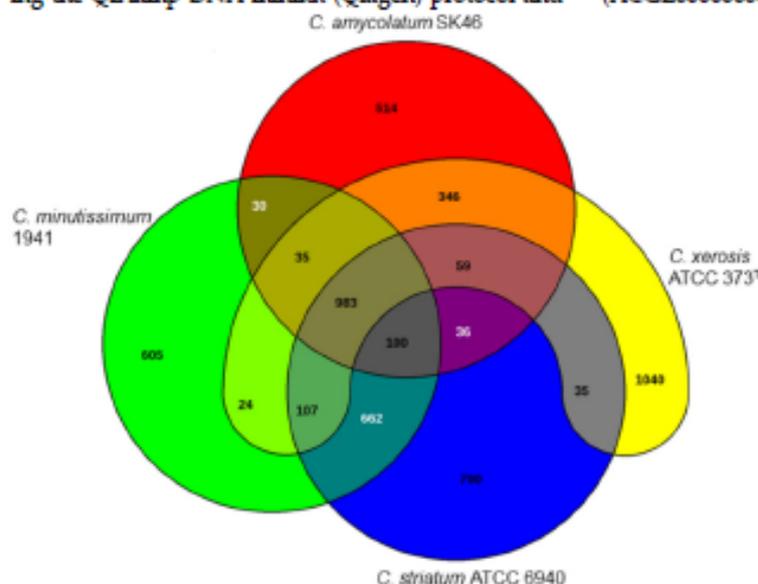


Figure 1. Venn diagram demonstrating the numbers of coding sequences shared by the four *Corynebacterium* species analyzed in this study.

detection of species-specific target genes for isolate's identification or drug susceptibility profiling. Analysis with the EDGAR server (edgar.computational.bio.uni-giessen.de) allowed for detection of 983 CDs shared by the four isolates evaluated in this study. Most importantly, it was possible to detect a number of distinctive genes for each species, when compared to each other: *C. xerosis* (1,040 CDs); *C. striatum* (700 CDs); *C. minutissimum* (605 CDs); and *C. amycolatum* (514 CDs) (Fig. 1).

Nucleotide sequence accession numbers. These Whole Genome Shotgun projects have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accessions LAY500000000 (*C. xerosis* ATCC 373^T) and LAYQ0000000 (*C. minutissimum* 1941). The versions described in this paper are versions LAY501000000 and LAYQ01000000.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian Research Funding Agencies CNPq, CAPES (PROCAD 071/2013), and FAPESP (JCB0031/2013).

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Martins C, Faria L, Souza M, Camello T, Velasco E, Hirata R, Jr., Thuler L, Mattos-Guaraldi A. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:905-913.
- Bernard K. The genus corynebacterium and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3152-3158.
- Ramana KV, Vikram G, PadmaWali P, K A, Rao M, Rao SD, MS RM, CH V, Rao R. Non Diphtheritic Corynebacteria (NDC) and Their Clinical Significance: Clinical Microbiologist's Perspective. *Am J Epidemiol Infect Dis*. 2014;2:83-87.
- Shin JY, Lee WK, Seo YH, Park YS. Postoperative Abdominal Infection Caused by *Corynebacterium minutissimum*. *Infect Chemother*. 2014;46:261-263.
- Funk G, Lawson PA, Bernard KA, Collins MD. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1124-1128.
- Boschert V, Berger A, Konrad R, Huber I, Hormansdorfer S, Zöls S, Eddicks M, Ritzmann M, Sing A. *Corynebacterium* species nasal carriage in pigs and their farmers in Bavaria, Germany: implications for public health. *Vet Rec*. 2014;175:248.
- Farfour E, Leto J, Barrault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, Le Guern AS, Lefloche A, Badell E, Guiso N, Leclercq A, Le Monnier A, Lécuit M, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Raymond J, Vimont S, Bille E, Carbonnelle E, Gast-Ravillet H, Lecuyer H, Beretti JL, Vay C, Berche P, Ferroni A, Nassif X, Joia-Lambert O. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2702-2707.
- Chevreaux B, Wetler T, Suhai S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. *Proceedings of the German Conference on Bioinformatics*. 1999;45-56.
- Bankovich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19:455-477.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008;9:75.

APÊNDICE I – SEQUÊNCIAS GÊNICAS UTILIZADAS PARA O DESENHO DE PRIMERS

Gene Marcador do Gênero – Amplicon de 513 pb

Cory_F: 5'- CAGGACTGGATCGACCACGACCCGAAG – 3'

Cory_R: 5'- CTCGGAGTAGCGGGCGCCGATGCG – 3'

>Corynebacterium_striatum_ATCC_6940_joined_51 putative esterase
>CORAM0001_2043 trehalose corynomycolyl transferase C
>Corynebacterium_minutissimum_1941_joined_59 putative esterase
>Corynebacterium_xerosis_NBRC_16721_joined_1612 putative esterase
ATGCGTAAAAATGCGTCTGCCCTAACCTGCGCTCTCCAGGTTCCCCGACCAAG
GCTCGCAAGGGTCTGGCCATCGCAGCTCTGCCGACCGCTGTAGCAGTTGGCCT
CGCTCTCCTGCCGAACGCAACCGCTCAGTCTTCTCTCGGAGACTTGACCCAGAA
CCTGGGAAGCTCCGGTCTTTCCGACTCCTTCGCGCCGAGCAACCCGCCGCAGC
GTACCCCGCTCAACACCGAGTACCCGACCATCGAGGGTCTGCCGGAGGGCGTT
GCTGTCTCCCGCGTGGAGTACCTCTCCAATCGCCACCTCAAGGTCTACATCAA
TCCGCAGCTATGCCGGATAAAGGAGCAGATTGTTTCAGATTTCAGCTCGCCCGCA
CTGGTACTCCAACCCGGAGAAGAAGTTCCCGGAGGTCTGGGCACTCGACGGCC
TGCGTGCGCGCGACGATGAGTCCGGCTGGACCATCGAGACTAACATCCTGAGC
CAGTACGCTGACCGCAATGTCAACGTCATCATGCCTGTTGGCGGCGAGTCCTC
CTTCTACTCCGACTGGCAGCAGCCGGACAATGGCCGTAACCTATAAGTGGGAATC
CTTCCTGACCAAGGAACCTCGTGCCAATCCTGGATAAAGGCATACCGCTCCAACCA
GAAGCGCGCCATCACGGGTATCTCCATGGGCGGTACGGCAGCCGTTAACCTGG
CGGAGCGCAACCCGCACCTGTTCCAGTTCGTCGTTCCCTTCTCCGGCTACCTG
GACACCACCACCCGGGGCATGCCAGAAGCAATTGCTGCCGCGCAGATGGATGC
AGGCGGATTTAACTCCACCAACATGTGGGGCCCGCACTACTCGCAGGACTGGA
TCGACCACGACCCGAAGCTGGGTATCGAAGCCCTCAAGGACATGAAGGTCTAC
GTTTCTCCGGCTCCGGCAAGGACGACTACGGCAACCTCTCCTCCGTGGCCAA
GGGCCCGGCTAACGCTGCAGGCGTCCGGTCTCGAGGTCATTTCCCGTATGTCCA
CCCAGACCTTCGTGGATTACGCCAAGCGTGCAGGGGTGCCGGTCGTGACACGC
TTCCGCCCATCCGGCGTCCACAGCTGGGAATACTGGCAGTTCGAGATGAACGA
GGCTTGGCCAACCATCGCTGACGCCCTCGGCATCCCGAAGGAAGACCGCGGT
GCAGACTGCACCCCGATCGGCGACATCGCAAAGGTGACCGAGTCCGGAATTAT
CGGCGAATGCCTTAACAACGAATACGACGTCGCAGGCGGCAAAGCTGAGGACT
TCCAGGCTGGCACTGCCTACTGGCACCCAGAAACCGGCGCTCACGCCATCTTT
GGCCGCATCGGCGCCCGCTACTCCGAGATCGGCGGCCCCGACCTCTTGGCTGG
GCTTCCCAACCACCGGCGAAGAGAAGACCCAGACGGCAAGGGACGCTTCGTT
CACTTCCAGCACGGCTCCATCTACTGGACCGCCGAGACCGGTGCCTGGGCAAT
TCCTGCCGACATGGTGAAGGCATGGGGCGAAAACGGCTACGAAAACGGCGACC
TCAAGTACCCGACCGCTGCAGTGGTCAAGGTCGGCGAAGGCTACGCTCAGGAA
TTCCAGAATGGTGTCTGACCCGTAACCCAGACGAGTCCAACCTCCGTGGTCCAT
GGTGCAATCGGCGCCAAGTACAAGGAGCTGGGTGGCCCTGCCTCCAAGCTAG
GCTTCCCGAAGGGCGGCGAAAAGCCAGTCAAGGGCGGCTTCTTCCAGGAATTC
GAGCACGGCAACATCTACTGGTCCGCAAACAGTGGGGCGCACTACATCCTCTA
CGGAGACATCATGGACGAGTGGGGTAAGCGCGGCTTCGAGCAGGGCGAGTTC

GGCTGGCCAACCACCGATTACACCGAAATCGCAGCGGGCGGCCTTTCCCAGGA
CTTCCAGCACGGTGTAAATCCGGCAAATCATGGGCACCGTTCAAGTGGAGAAGA
AGTAA

***Corynebacterium xerosis* – Amplicon de 106 pb**

Cxer-F: 5'- CGTGGACGAGGCTGGAATC -3'

Cxer-R: 5'- ACCAGTTTCGGGGTGAGGA -3'

>Corynebacterium_xerosis_NBRC_16721_joined_104 Permease of the
drug/metabolite transporter (DMT) superfamily

TTGACCATTTGCCCCATTGCGCTGGCCGCGTTGACGCTGGTGTGGGCGACGCT
GTGGTCCGGCGCATTGTCGCGATGAAGGTCGCCAGCGATCACGCCGGCGCG
TACACGATCGTCGGCATCCGCTGCACCATCGCGGGCGCCGTCATGATCGCCG
CGCCTGGGGCGCCCCGAAAGGCGTTGACCCGCCGCGGGTTGGCGGGCACGGC
CGTCGTCGGGCTGCTCAACAACGCGGGGTACCTCGGCCTGATGGCCACCGCC
ATGCCGAACCTGTCCGCGGGCATGGGCGCCATCGTCACGGCGCTGACGCCG
TGGCCGTCCTGGTGTATCTCCGCCCTGCGCGGCCGCGCACTGCTGTGGACGCA
GTGGATCGGCTGCGTCCTGGGTTTCCTCGGCGTCGTCGGCTCGGCGTGGACG
AGGCTGGAATCCGGCGAAACATCGTGGACCGGCGTGGCCACCAGCCTCTTCGC
GGTCTCCTGCCTGGTGTGGGACCATCCTCACCCCGAAACTGGTCCC GCCGG
GCAGCCCATGGCTGTGACCGGCATCCAGAGCCTCGCCGCGGGCGTGCCCGC
TCTCGCCGTCGCCTTGCTCTTCGAGGACGCCCGGAGTTGACCACGCGTTTCC
TCGTCGCCGAGGCGTACCTCATCGTCGGCGCCTCCGTGCTGGCCATGACCATG
TGGCTGACGCTGATCCGCCAGGCCGGCCCCGACCGCGCCGCGGCTCGCCACT
TCCTGCCGCCGCTGATCAGCATCGCCCTCGGCGCGCTGCTCCTCGGCGAGGA
CGCCTCCCCGCTGGCGCTGGCCATGTGCATCCCCGTCGCCATCGGCGTCCG
CTGGCCACCCGGCGGCCACGCTCCACCGCAGTGCCCCGAAAGCTCGACTGA

***Corynebacterium striatum* – Amplicon de 226 pb**

Primer Cst-F: 5'- CTTCGAAGAACATGAAGGCA -3'

Primer Cst-R: 5'- CCGTAGTACATCGCTACGGC -3'

>Ferrous iron transport permease EfeU [*Corynebacterium striatum*]

GTGGCGTTGGTCACCTACATGCTGCTGTGGATGCGCGGTGCTTCGAAGAACAT
GAAGGCAGAACTCGAGGGAAAGCTGGAGGCGGCCATCGCAGTGGGCGCGGGT
TCCGTCTTCGTCCTGGCATTGATGCGCCGCGGTCCGCGAGGGCATCGAGACAGC
GCTGCTGGTGTTCGATACCTTTGCCTACGGCTCCACCATGACGCCGGCGCTCG
GCCTTTCCCTAGGCATCCTCATCGCCGTAGCCGTAGCCGTAGCGATGTACTACG

GCGCAGTGCGCATCAACCTCGGCACCTTCTTTAAAGTCACCGGCATCTTGCTGG
TCGTCGTGGCTGCGGGCATCCTGCGCTATGGCATCACGGACTTGCAGGAAGCT
GGCCTGCTGCCGGGCCTGCACACACTCGCCTTCGACATCTCTAACGTC

Corynebacterium minutissimum

Amplicon de 304 pb

Cmin-F1: TATGATTTGCGGGCGCTCGTT
Cmin-R1: CAATCACCGCACCAATGACC

Amplicon de 311 pb

Cmin-F2: GCGCTCGTTCATAAACTCCG
Cmin-R2: CGTTATTCCACAGCCACCCA

>Corynebacterium_minutissimum_1941_joined_345 Putative membrane protein
TTGGACGCAGCAAAGCTGCTGTGGCGGTACCTGCCGCAGCTGATCACGGTGAT
TTGCCTGTCGCTGGCCGTGCGCGCGGCGGTGCTGTGGTTGGCGGTGGTTATTT
CTGAGTATTCGCCGTTGGCCGCCACGCTCATCTTCCCCTTTGCGCCGCTTTCTG
TGATGACCGGCGTCATCGTGTGCTTTTGGATCATGCAGCCGTCCATGGAGTTCT
TTGGCGGCGAGACCCGCTTTAGCAAACCTGGATAAGACCACGCTGCTGACCGTC
GGTGGCCTCCTCATCCCGTTCCTCACCGTGTATTCTCCACGGTCTGTTGCGC
GACGACGCGCGGACCTTTGTCTACGACTCCGTGACCATCGAGGTGGCCACCAG
CTTTCTCGATTATGATTTGCGGGCGCTCGTTCATAAACTCCGGATGGCTATTTGCA
GGGTTTCTCATTTCTATCGTGGTGTGCGCAAACCTCATTGGTGCAGCTGCAGTTG
GGGAGCGCGCCTTTGGCGTGGCCACTGCGGCCGCGTACCTGGAGGTGCTGT
GGATGGCCACGGCGTCGCTAAGCATCACCAGCAATTTTGAAGAAGTCCGTGTG
TGGATTCTTAGCCGGCAAGGCATTGGCCCCGTATGGGACTCTATTGTCACGGC
GAAGGATTGGATTGTGCGCCACACCTGGGTCATTGGTGCAGGTGATTGGGTGGC
TGTGGAATAACGCGGGCGCAAATCGGCAACTTTATCGTCGTGCCCTTCGCATGGC
TGACCCTCGGCGCGGTGGTCTACAACACGAGCCTGACCAGAGAGAAGGACAGT
TCTGAGCCGGACACGTCAGGCGAGGAGGACGCGGTACCGCCCCTGCAGACGG
TAGCCGATGCCCCATCGAAGGTCCCGCCGAACGAGGAAAGCTCTCCCCGCAT
GCCGAGCAGAAGATGTGGGCCGATTATGGGCGTCGCTATTCGGAAGCAGCCTT
CCGAACGACGCGAGACATGCTGGACAACGCCGCGCAGCCACTCGTCGGCCCC
TTCCGTAATGCGTGGCGCAATTTCAAGACGCTGGCAGTCGCCGGTGCAGGTCCC
CATGCTGACCTTCTGCCTCGTCTTCGTCTTGGCTTCGGGCGCTGAGCTGGGCG
TAGTCTATGCCCTGCGTGCCATCATCAAACCGCTGGCGCTGGGGACCATCACC
ATTGGGCTTGAGCCTTATGCGCTGGTTTTTGCCTGAGCCGTGTACTTCCTCGTT
GCGCTCCCGCTGGTGGTAGCCGCGCTGGACCGCTTCCTCAACGCTGAGTACGC
CGAGGCGGAGGACGCAGATGAGAGCACCGACGAAAACCAAGGCGAAGAGCCG
GACGCTGAATCTGCCGTCCCAGCGAGCCAGGCGGGAGAGAAGTAG

Amplicon de 296 pb

Cmin-F3: 5'- AAAACATTGTGCTCGGTCGC -3'

Cmin-R3: 5'- GATAAACACCATCGCCACGC -3'

>fig|38301.4.peg.126 Ribose ABC transport system, ATP-binding protein RbsA (TC 3.A.1.2.1) [Corynebacterium minutissimum 1941]

```
ATGAGTGAAACCGTCCTAAACTTGAAGGCGTAACCAAGTCCTTCGGCCCCGTT
GATGTCATTAAGGGGTCGACCTCAACGTTGCGCGAGGCCAAGTTCAAGCCCTT
TTGGGCGAAAACGGCGCCGGTAAGTCCACGCTCATCAAATGATTGCGGGCGT
ACACGAACCGGACTCTGGCCGCATACTAGTAGATGGCAAAGAAGTTAGAATCCC
CGATACTAAGGCCTCCGAGGCCCTCGGTATCGCCACTATTCACCAAGAACTCAA
CTTGGTGCCGACTATGTCGGTAGCTGAAAACATTGTGCTCGGTCGCACTCCGCA
ACGCTACGGACTTGCAACCGCAAGCATCTCAAGGCTCAAGCACAAGCAGCCC
TACACCTCATCGGACTTGATGTTGACTTGGATACTCCGGTGGGTGAGTTGGGCG
TCGCCAAGCAGCAGCTGGTTGAGATCGCCAAAGCCCTTTCATGAATGCGCGC
ATCCTTATCTTGATGAACCCACAGCCGCGTTGACCGGCAAAGAAGTCGATGCG
CTCTTTACAGTTCTCGAAGGACTCAAAGCAAAGGCGTGCGCATGGTGTTTATC
AGCCACCACCTGGATGAACTGGCACGGATCGCGGAGACCATTTGCGTACTGCG
CGATGGTGCCTTCATCGCCGAGGTCCCTTCCGATACAGATGAGGATGAACTGG
TCCGGCTGATGGTTCGGTCGCAGTATCGAAAACCAAGTACCCGCGCGACTCCG
CCCGAGCGCGGCGATGTCTTGCTTGAAGTTGCAGGCCTGACTACACAAGGTTT
GTTTCAGGACATCTCCTTCGAGGTCCACTCCGGCGAAGTTGTCGGTCTCGCCG
GACTTGTCGGCGCTGGCCGCACGGAGATCATTGTCGCCATTGCTGGCGCAGAC
ACCTACGATTCAGGATCCATTCGTGTGAATGGCCAAGAACTTCGAGGCGGCGA
CATCGGCGCCGCAATTCGCGCCGGGGTGGGACATATCCCCGAGGACCGGAAA
GCACAGGCGCTAGTCCTGGATGCTTCGGTAGCAGACAATCTCGGTTTTACGAC
GCTCTACCCACCGCTAGAGCTGGGATTGCGGACCGTTCTGGCCAACATCGGC
GTGCGGGAGAAGTGGCAGAAAACTTCGTATACGCATGTCCGGGCTTGACCAG
GCTATCCGCAATCTCTCCGGCGGAAACCAGCAAAGGCAAGTCTTCGGCCGGTG
GGTCTCGCCAACCTCAAAGTTCTTACTCGATGAGCCAACCCGCGGCGTCGA
CGTAGGCGCCAAGGTCGAAATCTACAACATCATTAACGAGGTTACGGCAGCCG
GTGGCGCGGTCCTCATGGCTTCCTCTGATCTACCAGAGGTAATTGGAATGTCTG
ACCGGATCCTCGTCATGTCAGGGGGCCAACCTTGCCGGGCAACTGCCAAAAGAC
TCCACTCAAGACGAGGTCATGACCCTCGCCGTAGCCAACGTAACCTCAGCAACC
TCCGCTGCCGCTACTAACTCCGCTAGCCACGACCCCAAGGATTAA
```

Amplicon de 317 pb

Cmin-F4: 5'- CGTCAGCGCATAACTCTTGC -3'

Cmin-R4: 5'- ACATTGTCGGAGGCAACCAT -3'

>fig|38301.4.peg.128 Ribose ABC transport system, periplasmic ribose-binding protein RbsB (TC 3.A.1.2.1) [Corynebacterium minutissimum 1941]

ATGAAAAAGATCATTTCTGCGGTTCTCGTTGCCGTTCTTGCTTTGGGTTTGGTCT
CATGCAACCGCTCGGAGGAAGACCGTCAGCGCATAACTCTTGCGCTATCAACC
CAGACAAACCCCTTCTTCGTTGAGCTACGCCATGGCGCACAGGACAAGGCCAA
AGAACTCGGAGTCCCCCTCGATATCCAAGACGCCTCGGATGATCCTGCTCAGC
AAGTCAATCAACTCGGCAACGCTACGTCGATGGGCGCGAAAGTGGTGGTTGTT
AACCCACAGACTCCGATGCTGTAGCTCCAGCAGTACGCGGAATCAAGAACAAT
GGTGTCCCTGTGGTTCGGTGTAGACCGCGACGTTAACGGCGTAGATTTGGATTC
CATGGTTGCCTCCGACAATGTCGCCGGCGGTGCCCAAGCAGCAGATCAACTGG
CCAAATCCATCGGCGAGGAAGGTGACATCCTCATCCTGCAGGGCACCGCAGGT
ACGTCGGCCTCGCGCGAACGTGGCAAGGGCTTTGAGTCACAGATTGCCAAGTA
CCCGGGCATCAAGGTGGTTGCTAAACAGTCGGCAAATTTTGATCGTACAGAGG
GGCTCAATGTAGCCACCAACCTTTTGCAAGCCAACCCGAACATCAAGGCCATCT
TTGCGGAGAACGATGAAATGGCCCTTGCGCCGTGGAAGCCCTGGGATCGCGC
GCTGGTTCCGAGGTCAAGATCGTGGCCTTTGACGGTACTTTGACGGACTTAAG
GCTGTCAAGGACGGCAAGCTGGAAGCTACTATCGCTCAGCAACCAGCCGAGCT
CGGTGCCCGCGCCATCGAGCAAGCCGCACAACCTCCTGCATGGTGAAAAGGCAC
AGAAATCTGTCCCCGTAGAAGTCATCACCGTTACCCGCGACAACGTAGAGGAAT
TCCAATGA

Corynebacterium amycolatum

Amplicon de 413 pb

Camy-F1: GTGCCCAGTCATACCAGCTT

Camy-R1: CAAGCCCTACTTGCCTCCA

>CORAM0001_2016 putative enterobactin synthetase component

ATGTATGCATCAGATATCGCTTTGGATGACCGTTCAGTAGCGAGCAACGGGGAC
GATTCAAATATGCAAGAGGCATGCCGTAACGCCCTTTCCACTCTGCTGGATAAC
TCGGCCCTTCCCCCGGGAGTGTGGTTGCAATACGTGATCTCGTTCCCTCAGGC
GCATGCGGCGACCCTAGCCGAACGTGGGCACGTGGCCTCGTCCCTGCCATAC
TTGATCCTCACCTACCTGAAATGCTGCAGCCAGTTCTGCTCAGCGAACTTTTTCC
AGCAGCTGTTCTCGCATGGACGATTTACAGTCAGAGCAAGGCGAATCCTTTCA
GCCCTGTCCAATGTTGGACTTAGCGTCTCCAGATTCCCAACCTCGGAGATTCCG
ACTGACATCGCAGTTTGCATCAGCAAGTAACAACGACATCCCGGCATATATCGC
CTACACGTCCGGCTCAACCGGGACACCGAAAGGCGTTGTTATCGGACGGCGTG
CATTCAAATCTTTTGTCCAATCGACTTGCGATTTATACGAATTGACCTCCGAAGA
TCGTCGATTGCTGCTGTCCAATCCGGCCTTTGACCTGGCCATGGAGCAGGTGG
GCACTTCTCTACATGCTGGGTGCCAGTCATACCAGCTTCTCCAGGACTTATCG
CAACAGATCCATTTGCTCTTGCTGCCGAAGTTTGTGCCCGTGGAATCACCGTAC
TTAGCCTCCCCACTGGTGTCTTCAATGCTGTGCGTACTGCTATGGATGCCGACA
CTTCTGCAGCATCAGCATTTCATCAGTCTTCTGTGCGCCTTGTGATGGCCGGTG
GTGAAGCCCCTGACCCCGTCGCCATCCGTGGTTGGGCCGCAGCACTGCCGGA
AGCACGGCTGCTCAATGGTTACGGGCCGACCGAATGCACAGTTGTGACTTCGT
ATGGCAATCTTGCGCCGGATGAACCCATTACCGTTGGTACTCCACTTCTGGTG
TTACCTATTCCCTGCGAGATGGCGAGCTCATCATTGGTGGAGTGCAAGTAGGG
CTTGGGTACTTAGAGAAGCGTGTAGGTGGCTTCGAATCGCATAACGGAGATACC
TATGCCACTGGAGATGCCGCTCAAGTACTTGCAGACGGAAGGTGGGTTATCGA

AGGGCGTCGTGACCGAATGCTGAAGGTATCCGGGTACCGTGTCGACCCGGCCA
CGGTGGAAGGGATTGTTACCTCTGTGGATGGGGTGAGCGCAGCCCATGTTGTA
CGCGTCGATGGTGCGTTGGGGTGCCTTATTGTCCCTGACACCGTACGCAGCTC
CGAGTCTTGGAACAGCCAAGATTCTGCAGTTGAAGAAGTCAGCAGCGGGCGAGG
ATATGATCAAACGTGCGGTGAGTCGTGCGTTGCAAGACCGAACTTCCCTGGTATG
CGGTGCCTCGGCTACTAGGTATGGCCAGCGAGATTCCGCTGACGGCGCGAGG
TAAGCGCAATCCAGAAGCGACTGCGAGTCTATTACGATGTCTTGCTCGTAGCGC
AGATAGGGACTCCGCCCGCGCCGGTTTGGATCTCGACTTCGCAATTTCCGGAGA
TTTGGAGGCGGTATGTAGGTGATCCGGAAGATCTTCGTAGCTTTGCTGAGACTG
GAGCGGATTCACTAACCGCTGTTTCGGTGCCTGGGGCTCTTCTCGGCGAGCTA
GATGTAGATGTGCCCTTACCGGTCATCGTCCGGTGGGAATGTGAGAGATCTCATC
GATGCTTCTCACCGGGCTCGTGCTGGGGTGCATGCAGGACATTTGTCGTCAGG
TCAAGGGCTCGTGCGGCTGCGCGGGACAGCACAGAGCGACAGCACAGGTGAC
CATTCTGTTAAGGAAGTGCAGTGGGTGTTTCTGCCTCCGATGTCCGGGTGCCGTT
ACCCGGTATTTACGTTTGTCTCGTTTGTGCTGCCGGATTCTCACCAGGTCAGTGCA
TGTGAGAATGCGCGGGAGGATCTCGAAGGCGGATTCGCCACGGCGGTCTCCG
CTATGTCTGACGCGATTGCTGCAGAAATTCCAATTGATGCAGACTTGCGTCTCT
CTGGGTTCTCCCTCGGCGGAGTCTATGCGCGTGCAGTAGCAGTCGAGCTCGCT
TCCCGTGGGTTACCTGCTGTTCCGGCTCACCTTATCGATCCGCCAGACCCAGT
GGACATGCCACTCCGGAAGGACGGCATTCTCGTATTTGCTCAGGTAGGATTG
GCTATACCTGGTGACGGTGCAGGATTTCTTCGTGGCCCCGTAGCCACTGGTGA
GGTAGCCGAAGTTCGCGAAGACGACATTGCCTGGGACGAACTTCTCAATGCCG
CAGTAGCTACAGGAATGGCCACGATGAATGAAGGAACCCAAGCTCTGCGTAAC
GCATGGGAGATTTATCGTCTCAATGCTTCTATTCTCAGATCCTGCGACGTAGATG
AGATTGCTGGGCAACTGCCCAAACGCGAATCCTTGTAGGCGCGACTGGGGAA
GATATTGCTTATGACGGGGCAGTGCAGACAGAGGAGAAACCGCACATGCGCA
GATAGAGCGCGTGGCGCCGAGCGGAGCATGGTCAAAAATCTGTCCGTCAGCAA
CTTTTGATCGACTTGGTATTGATCACTTTGCTCTACTCGATCCTCCGCACGATAT
CGCTGTAGCTCAATGGCTCACTACTAGTGAGGCAGCATCGAACGCGGGATAA

Amplicon de 434 pb

Camy-F2: 5' – ATGACCAAGACGGATGCTGG -3'

Camy-R2: 5'- TTGGTGGGAACGAAACCACA -3'

>fig|43765.4.peg.318 Lysophospholipase (EC 3.1.1.5); Monoglyceride lipase (EC 3.1.1.23); putative [Corynebacterium amycolatum SK46]

GTGCAGATTGTCCACGGCATGGTTCGAGTACGCCAACCGCTACGCCAAGTTCGC
CGAGTACCTCGTATCCCAGGGCTATGCCGTGCTCGCGCACGACCATCGCGGCC
ACGGTATGACCAAGACGGATGCTGGCATCCCGGGCTACTTCGCTGACTACGGT
GGCTGGAACCTGATTCTCGAAGATCTCCACGCAGTGCGCCAGTACGTTGATGC
AGAATTCCCAGGCAGCAAGCACTATATTCTCGGCCACTCCATGGGGTTCGTTCT
GACTCGTAACTACATCGCCAAGTACGGCGAGGGGCTTACCGGCGTCATTATCAT
GGGCACTGTGTCGTGGCCAGGAGCTAAGGGCGATGCGGGGAATGAAGGTTGCA
AACCTGCTGGCTAAGATTGCTCCTACCGCGCCGGGCAAGCTGCTCAACACCCT
CACCTTTGCTGATTACAACAAGGGCTTTGAGCGCCGCACTAAGTTTGATTGGCT
CACCCGCGATCACAAGATTGTCGATGCTTATATTGCGGACGACAAGTGTGGTTT
CGTTCCCAACCAATGCCTTTTTCCGCGACCTTCTCGTCCGCGCACGCACTACGCGAA

TTCGTCTGAAGCCTATGAGAAAGCGCCTGCTGAGCTGCCGCTTTTCGTGGTTTC
CGGTGCTGTTGATCCGGCGGGTGGCGCTGCCTGTGTGACTGAGGTCGTGGGC
AAATACCTGAACGCGGGCAAGAAGGACGTGCGCTTTAAGGTCTACCCGGATGG
TCGCCATGAGATTCTCAACGAGTTGAATAAGGAAGAGGTCTACGCCGATATTT
GGCGTGGTTGGAGTCCCGCTAA

Amplicon de 402 pb

Camy-F3: 5'- CGTTATCCAGCAAATCGGCG -3'

Camy-R3: 5'- ACTCTAGCCACCAACATCGC -3'

Product: 402 pb

>fig|43765.4.peg.108 Multiple sugar ABC transporter, ATP-binding protein
[Corynebacterium amycolatum SK46]

ATGGCTGAAATTGAACTAAAGCACGTGTACAAGCGCTTTCCTGATGGTCACATC
GGTGTGGAAGACGCTAATCTCAAAATCGACGATGGCGAGTTCATCATCCTCGTC
GGCCCCTCCGGCTGTGGTAAGTCGACGATGCTGAACATGATTGCAGGGCTGGA
GGACATCTCCGAAGGCGACCTGCTCATCGGCGGCGAGCGCATGAATGATGTTG
CTCCGAAGGACCGCGATATCGCTATGGTCTTTCAGTCCTACGCGCTGTACCCGC
ACATGAACGTCCGCGAGAACATCGCTTTCCTCCCTCAAGCTGGCAAAATTGCCGA
AGAAGGAGATTGAGAAGAAGGTCAACGAGGCCGCCGAAATTCTCGATCTGACG
GAGTTTCTCGACCGCAAGCCCGCGCAGCTCTCCGGCGGTCAGCGCCAGCGCG
TGGCGATGGGCCGCGCCATCGTCCGCCGACCAAAAGTCTTCCTCATGGACGAG
CCCCTTCCAAATCTCGACGCCAAACTCCGCGTCCAGATGCGCACAGAAATCGCC
CAGCTGCAGGATCGTCTCAGCACCACCACCGTCTACGTCACCCACGACCAGAC
CGAGGCCATGACGCTGGGTGACCGCGTCTCGTGTGAAAAGGGCGTTATCC
AGCAAATCGGCGCGCCGCAAGAGCTCTACCACCGACCGGTCAACGTCTTCGTC
GCCGGCTTCATCGGCTCGCCCGCCATGAACTTCTTGCCCGCCACCGTGCTTGA
CGACGGGCGCAGCGCCGACACCGCCCTGGGCCACCTTCCACTCCCGGAAAAA
TTTACTCCGGGTGCAAAGGTTATCGTCCGTCTGCGACCGGAGGCCTTCGAAGA
TGCCGCCTTGCTTGACGACGGCTCAGATGTGCCACCGGTGGATGTGAGGTGT
CCGTCCTGGAGGCGATGGGCTCCGAGCAGTTCATCCACTTCCACTCCCGGAA
ATTGATTTGAGTGGACATGCAGCGGCTGAGGAGGCTGGTCTAGCCGATAATCC
GCACGCGATGTTGGTGGCTAGAGTCGATGCGGAATCGAGCGTGCACCGAGGTC
AGAAGATTAAGCTGGCAATCAACGCGGAGAAGCTTAATGTCTTTGATTCCGAGT
CGGGTGAGAACTTGGCGTTGAATGCGAAGAATGAAGGTTAA

Amplicon de 416 pb

Camy-F4: 5'- GGTGGCCGCTGAATTTGAAG -3'

Camy-R4: 5'- CGGGAACGTCCTTAGTCACC -3'

>fig|43765.4.peg.1306 Maltose O-acetyltransferase (EC 2.3.1.79) [Corynebacterium
amycolatum SK46]

ATGACTACCGAATCCCGCATTGCAGAGCTCGAGGCAGCTCGCCGAGCCTCATT
GCGCAACACCGATCGAGATCCGAATCCGTCGACCACACTTCCCGACGACGGTC
TGGATAACCGCCAGCGCATGTTGAACGGTCAGTGGTATATCGCGGACCATCCG
GAATCACAGGCTCTGAACGCGCGAATTGGCCAGGTGGCCGCTGAATTTGAAGT

AGCCTTTCGCAAAGATCAACAGGCGGCACAGCGGGTGCTGGCACC CGCATTGG
GGTCTTTCGGCAAGAACAGCACAGTGCGCCCGCCGGTCTACCTGGACTACGGT
GACAACGTTACATCGGAGACAACGTATTCATTA ACTTCGGCCTCACCGCTCTT
GACGTGGTGAAGGTGACCATTTGCGACCATGCGCAGCTCGGCCCAACGTTCA
GCTACTTCCACCGGTGCACCCACTGGGAGCTGAGGCCCGCGCCGCTTATCTAG
AGTCTGGAGATGAAATCATCATCGGACGCAATGCCTGGATCGGTGGCGGAGCC
ATCATCCTGGGCGGTGTTACGTGCGCGATAATTCTGTAGTCGCCGCGGGTGC
CGTGGTGACTAAGGACGTTCCCGCGGGCGTAGTCGTGGCTGGAAACCCGGCG
AAAATTATCCGCCTCATCGAGGCGTGA