

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

Rebeca Vitória da Silva Lage

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DO BIOFILME DE LINHAGENS DE
Stenotrophomonas maltophilia ISOLADAS DE UMA INDÚSTRIA DE
IMUNOBIOLÓGICOS

Rio de Janeiro

2023

Rebeca Vitória da Silva Lage

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DO BIOFILME DE LINHAGENS DE
Stenotrophomonas maltophilia ISOLADAS DE UMA INDÚSTRIA DE
IMUNOBIOLÓGICOS

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

Orientadores: Dra. Maria Helena S. Villas Bôas
Dr. Marcelo Luiz Lima Brandão

Rio de Janeiro

2023

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Lage, Rebeca Vitória da Silva

Caracterização polifásica e do biofilme de linhagens de *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas de uma indústria de imunobiológicos. / Rebeca Vitória da Silva Lage. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2023.

106 f. : il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2023.

Orientadora: Maria Helena S. Villas Bôas e Marcelo Luiz Lima Brandão.

1. *Stenotrophomonas maltophilia*. 2. Controle de Qualidade. 3. Biofilmes. I. Título.

Polyphasic and biofilm characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from an immunobiological industry.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Rebeca Vitória da Silva Lage

CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E DO BIOFILME DE LINHAGENS DE
Stenotrophomonas maltophilia ISOLADAS DE UMA INDÚSTRIA DE
IMUNOBIOLÓGICOS

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

Aprovado em: 27/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Verônica Viana Vieira
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Dra. Angela Corrêa Freitas-Almeida
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Dra. Luciana Veloso da Costa
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos –FIOCRUZ

ORIENTADORES

Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ

Dr. Marcelo Luiz Lima Brandão
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos –FIOCRUZ

Ao meu marido Lucas, meus pais Simone e
Maciel e minha tia Ivonete (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todo Seu amor, graça e misericórdia que me trouxeram até aqui. Sou grata a Ele por ter me dado força, sabedoria e por ter me acompanhado em cada etapa desse processo, sem Ele nada disto seria possível.

Agradeço ao meu esposo Lucas por todo apoio e palavras de incentivo. Obrigada por sonhar e crescer comigo, minha trajetória tem sido mais leve e feliz com você.

Aos meus pais Maciel e Simone, por todo amor, compreensão, cuidado e dedicação. Reconheço e sou grata por todos os sacrifícios que fizeram para priorizar minha educação. Agradeço por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos meus sogros Miranda e Regina e minha cunhada, Thaissa. Obrigada por me adotarem como filha, por toda a torcida e incentivo para realizar esse projeto.

Ao programa de Pós-Graduação do INCQS.

Aos meus orientadores, Maria Helena e Marcelo, a quem admiro muito como pessoas e profissionais. Obrigada por todos os incentivos, ensinamentos e compreensão, me sinto privilegiada por ter sido orientada por vocês.

A Bio-Manguinhos e aos amigos que fiz lá, em especial, Luciana e Talita, por todas as risadas, palavras de incentivo e apoio. Obrigada por sempre enxergarem o melhor de mim.

Aos alunos do Laboratório de Controle Microbiológico, graças a vocês me sinto uma profissional melhor e mais preparada. Em especial, a Giovanna, que me ajudou na execução desse projeto e não desanimou frente as dificuldades.

Às colegas da SEPIN, Adriana, Lygia, Cristhiane e Luciane por toda ajuda e contribuição.

As parcerias que fizemos ao longo desse trabalho, ao professor Victor Midlej que nos ajudou a realizar a análise por microscopia eletrônica e ao professor Stephen Forsythe, por todas as correções e ajuda durante a redação do artigo.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

O conhecimento da microbiota associada a processos produtivos de diversas fontes é estratégico para a adoção de medidas preventivas ou corretivas, assim como na avaliação dos riscos associados aos processos. Alterações nesta microbiota podem indicar desvios das especificações estabelecidas, que podem levar ao descarte de produtos. Microrganismos produtores de biofilme, como a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, adquirem maior resistência à ação de agentes físicos e químicos, o que pode contribuir para a prevalência desses patógenos em alguns ambientes. *S. maltophilia* é um patógeno humano oportunista, produtor de biofilme e frequentemente isolado em ambientes da indústria farmacêutica. Este trabalho teve como objetivo a caracterização polifásica de cepas de *S. maltophilia* isoladas de uma unidade farmacêutica por meio de técnicas fenotípicas e moleculares, assim como a avaliação da formação de biofilme e sua tolerância frente a desinfetantes. Duzentas e setenta linhagens previamente identificadas como *S. maltophilia* pelo VITEK®2 foram avaliadas. Quarenta linhagens de diferentes perfis fenotípicos foram selecionadas e submetidas a identificação por *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS), análise do gene 16S e 23S rRNA. MALDI-TOF MS identificou 37 (92,5%) cepas como *S. maltophilia*, e três (7,5%) cepas não foram identificadas. O sequenciamento do 16S rRNA foi capaz de identificar 39 (97,5%) linhagens como *Stenotrophomonas spp.*, ou seja, apresentou como resultado mais de uma espécie dentro gênero *Stenotrophomonas* como possibilidade. Uma (2,5%) linhagem foi identificada em nível de espécie como *Luteimonas huabeiensis*. A PCR espécie-específica utilizando o gene 23S rRNA produziu resultado positivo para 39 (97,5%) linhagens. Entretanto, após o sequenciamento, duas linhagens foram identificadas como *Stenotrophomonas rhizophila*, mostrando resultados falso-positivos. Por meio da tipificação por *Multi-locus sequence typing* (MLST) foram descritos 33 alelos novos e identificados 17 ST distintos, sendo 8 novos no banco de dados. Já o ERIC PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction*) identificou 35 perfis diferentes. Das 37 linhagens identificadas como *S. maltophilia*, 36 (97,3%) apresentaram biofilme classificado como forte ou moderadamente aderentes, no qual apenas o hipoclorito de sódio em concentrações $\geq 1,00\%$, foi capaz de reduzir 100,00% do biofilme produzido. Não foi observada capacidade agregativa em

nenhuma das linhagens estudadas. Todas as linhagens apresentaram sensibilidade a minociclina, levofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim. Conclui-se que o MALDI-TOF MS provou ser uma metodologia satisfatória para a identificação de linhagens de *S. maltophilia*, mas a expansão do banco de dados é necessária para a identificação de outras espécies do gênero. O sequenciamento do gene 16S rDNA mostrou baixa resolução para diferenciação de espécies do gênero *Stenotrophomonas* devido à estrita relação genética. A PCR utilizando o gene 23S rRNA para identificação de *S. maltophilia* foi capaz de diferenciar o gênero, mas não foi capaz de diferenciar *S. maltophilia* de *S. rhizophila*. O ERIC-PCR e o MLST demonstraram ser ferramentas úteis para o rastreamento de fontes microbianas da *S. maltophilia* em instalações farmacêuticas.

Palavras-chave: *Stenotrophomonas maltophilia*. Controle de qualidade. Caracterização polifásica. Biofilme.

ABSTRACT

The knowledge of the microbiota associated with production processes from various sources is strategic for the adoption of preventive or corrective measures, as well as in the evaluation of the risks associated with the processes. Changes in this microbiota may indicate deviations from the established specifications, which may lead to product discarding. Biofilm-producing microorganisms, such as the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*, become more resistant to the action of physical and chemical agents, which may contribute to the prevalence of these pathogens in some environments. *S. maltophilia* is an opportunistic human pathogen that produces biofilm and is frequently isolated in pharmaceutical industry environments. The aim of this study was the polyphasic characterization of *S. maltophilia* strains isolated from a pharmaceutical facility by phenotypic and molecular techniques, as well as the evaluation of biofilm formation and tolerance to disinfectants. Two hundred and seventy strains previously identified as *S. maltophilia* by VITEK®2 were evaluated. Forty strains with different phenotypic profiles were selected and submitted to identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), 16S and 23S rRNA gene analysis. MALDI-TOF MS identified 37 (92.5%) strains as *S. maltophilia*, and three (7.5%) strains were not identified. 16S rRNA sequencing was able to identify 39 (97.5%) strains as *Stenotrophomonas spp.* One (2.5%) strain was identified at the species level as *Luteimonas huabeiensis*. Species-specific PCR using the 23S rRNA gene yielded positive results for 39 (97.5%) strains. However, after sequencing, two strains were identified as *Stenotrophomonas rhizophila*, showing false-positive results. Through the Multi-locus sequence typing (MLST), 33 new alleles were described and 17 distinct STs were identified, 8 of which were new to the database. ERIC PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction*) identified 35 different profiles. Of the 37 strains identified as *S. maltophilia*, 36 (97.3%) showed biofilm classified as strongly or moderately adherent, in which only sodium hypochlorite at concentrations $\geq 1.00\%$, was able to reduce 100.00% of the biofilm produced. Aggregative capacity was not observed in any of the strains studied. All strains showed sensitivity to minocycline, levofloxacin, and sulfamethoxazole-trimethoprim. It is concluded that MALDI-TOF MS proved to be a satisfactory methodology for the identification of *S. maltophilia* strains, but expansion of

the database is necessary for the identification of other species of the genus. Sequencing of the 16S rDNA gene showed low resolution for differentiation of species of the genus *Stenotrophomonas* due to the strict genetic relationship. PCR using the 23S rRNA gene for identification of *S. maltophilia* was able to differentiate the genus, but was not able to differentiate *S. maltophilia* from *S. rhizophila*. ERIC-PCR and MLST have been shown to be useful tools for screening microbial sources of *S. maltophilia* in pharmaceutical facilities.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*. Quality control. Polyphasic characterization. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais marcos na história da vacinação no Brasil.....	22
Figura 2 - Processo de formação do biofilme.....	28
Figura 3 - Patogenicidade de <i>S. maltophilia</i> e mecanismos de resistência a antibióticos.	34
Figura 4 - Representação das etapas envolvidas na técnica do <i>Multi Locus Sequence Typing</i>	39
Figura 5 - <i>Minimum Spanning Tree</i> apresentando as relações genéticas entre as linhagens (n=1.093) depositadas no banco de dados de <i>S. maltophilia</i> no PubMLST e discriminadas de acordo com a fonte de isolamento.	40
Figura 6 - Preparo da amostra por meio do Kit MicroSeq.	46
Figura 7 - Dendrograma do perfil proteômico das 40 linhagens de <i>S. maltophilia</i> selecionadas para este estudo.	61
Figura 8 - <i>Neighbor-joining</i> com base em sequências quase completas do gene 16S rRNA (1.314 pb) mostrando a posição filogenética das linhagens avaliadas neste estudo (n=40) com espécies estreitamente relacionadas.....	65
Figura 9 - <i>Minimum spanning tree</i> entre os ST de <i>S. maltophilia</i> e a origem de isolamento.	69
Figura 10 - Árvore filogenética “ <i>maximum likelihood</i> ” baseada nas sequências dos sete genes do MLST concatenados (3951 pb) das 20 linhagens de <i>S. maltophilia</i> e espécies relacionadas depositadas no banco de dados PubMLST.	70
Figura 11 - Perfil de bandas representativo de 37 linhagens de <i>S. maltophilia</i> selecionadas para este estudo por <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction</i>	71
Figura 12 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B369.2020, B8541.2014, B1974.2018, B199.2020, B0187.2021, B316.2016, B475.2018 e B1113.2018 por meio de microscopia eletrônica de varredura.	74
Figura 13 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B1140.2018, B810.2015, B052.2020, B203.2020, B427.2021, B759.2015, B592.2018 e B1370.2018 por meio de microscopia eletrônica de varredura.....	75

Figura 14 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B1686.2018, B1807.2018, B119.2019, B947.2016, B1549.2015, B1385.2018, B770.2019 e B2022.2018 por meio de microscopia eletrônica de varredura.	76
Figura 15 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B1311.2018, B132.2019, B1142.2020, B1117.2018, B1053.2020, B400.2017, B757.2017 e B368.2020 por meio de microscopia eletrônica de varredura.....	77
Figura 16 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B580.2020, B748.2020 e B843.2017 por meio de microscopia eletrônica de varredura.....	78
Figura 17 - Análise morfológica da formação de biofilme da linhagem B1689.2028 em superfícies de aço inox, poliestireno de baixa densidade e vidro por meio de microscopia eletrônica de varredura.	79
Figura 18 - Frequência da classificação do biofilme após o tratamento com os desinfetantes.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da análise de similaridade dos perfis bioquímicos obtidos a partir das 47 provas bioquímicas do VITEK®2.....	58
Tabela 2 - Linhagens de <i>S. maltophilia</i> (n=40) selecionadas para este estudo.	60
Tabela 3 - Resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA para a identificação das 40 linhagens selecionadas.....	63
Tabela 4 - Comparação entre a identificação por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA e do gene 23S rDNA.....	66
Tabela 5 - Resultados obtidos após o sequenciamento dos genes <i>housekeepings</i> utilizados para a tipificação das linhagens de <i>S. maltophilia</i> pela técnica <i>Multi-locus sequence typing</i>	67
Tabela 6 - Classificação e tolerância do biofilme frente a desinfetantes das linhagens de <i>S. maltophilia</i>	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vacinas de uso humano produzidas parcialmente ou em sua totalidade em território nacional.	23
Quadro 2 - Concentração máxima de partículas permitidas no ar.....	25
Quadro 3 - Limites recomendados para o monitoramento microbiológico de áreas limpas durante operação.....	25
Quadro 4 - Categorização dos resultados das provas bioquímicas obtidas no VITEK® 2.	43
Quadro 5 - Protocolo de reação para PCR de <i>S. maltophilia</i> usado na tipificação por <i>Multi-locus sequence typing</i>	49
Quadro 6 - Sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos oriundos da amplificação dos genes do <i>Multi-locus sequence typing</i> para <i>S. maltophilia</i>	50
Quadro 7 - Protocolo de reação de sequenciamento de <i>S. maltophilia</i> dos produtos oriundos da amplificação dos genes do <i>Multi-locus sequence typing</i>	51
Quadro 8 - Critérios para classificação do biofilme.....	54
Quadro 9 - Desinfetantes utilizados para avaliação da tolerância do biofilme de linhagens de <i>S. maltophilia</i>	54
Quadro 10 - Critérios para classificação da capacidade agregativa de linhagens de <i>S. maltophilia</i>	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Fontes de isolamento das 270 linhagens de <i>S. maltophilia</i> isoladas durante o período de 2014 a 2021.	59
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
API	Água para injetáveis
APO	Água potável
APU	Água purificada
ASC	Ágar sangue de carneiro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVP	Amostra de validação de processo
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAZ	Ceftazidima
CBAS	Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde
CC	Complexo clonal
CEN	Comitê Europeu de Normatização
CEF	Cefiderocol
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CN	Controle negativo
CTV	Complexo Tecnológico de Vacinas
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dntp	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	Densidade óptica
DTP	Difteria, tétano e pertussis
ECC	Estratégia de Controle de Contaminação
EMA	<i>European Medicaments Agency</i>
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction</i>

EUA	Estados Unidos da América
EU Ph	Farmacopeia Europeia
F	<i>Foward</i>
FAP	Fundação Atauulpho de Paiva
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FMA	Fortemente aderente
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
Funed	Fundação Ezequiel Dias
G	Gramma
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
Kb	Kilobase
µL	Micro litro
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LIC	Limite inferior de confiabilidade
LPS	Lipopolissacarídeos
LSC	Limite superior de confiabilidade
LVX	Levofloxacina
MA	Moderadamente aderente
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
MLST	<i>Multi-locus Sequence Typing</i>
MIN	Minociclina
Min	Minuto
MP	Matéria-prima

MS	Ministério da Saúde
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pasni	Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos
Pb	Pares de base
PDA	<i>Parenteral Drug Association</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunizações
Pmol	Picomol
POP	Procedimento Operacional Padrão
R	<i>Reverse</i>
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SARS-Cov-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus 2</i>
Seg	Segundo
SEPIN	Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
SIP	Soluções intermediárias de processo
SUS	Sistema Único de Saúde
ST	Tipo sequencial
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TGC	Tigeciclina
TSA	Ágar caseína-soja
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages</i>
USP	Farmacopeia Americana
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta

V	Volts
µg	Micrograma
Ø	Diâmetro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Vacinação no Brasil	21
1.2 Fabricação de imunobiológicos	24
1.2.1 Contaminação microbiana na indústria de biológicos	24
1.3 Controle de Qualidade	29
1.4 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	32
1.4.1 Produção de biofilme e resistência a antimicrobianos	34
1.5 Métodos para identificação e tipificação de bactérias	35
1.5.1 Métodos fenotípicos	36
1.5.1.1 VITEK® 2.....	36
1.5.1.2 <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>	37
1.5.2 Métodos genotípicos.....	37
1.5.2.1 <i>Análise da sequência de genes que codificam o RNA ribossômico</i>	37
1.5.2.2 <i>Multi-locus sequence typing</i>	38
1.5.2.3 <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensu - Polymerase Chain Reaction</i> 40	
1.6 Justificativa	41
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 METODOLOGIA	43
3.1 Linhagens bacterianas	43
3.2 Caracterização do perfil bioquímico	43
3.3 Caracterização proteômica por <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>	44
3.4 Caracterização genotípica	45
3.4.1 Sequenciamento do gene 16S rDNA	45
3.4.2 Análise do gene 23S rRNA	48
3.4.3 Tipificação por <i>Multi-locus sequence typing</i>	49
3.4.4 Tipificação pela técnica de <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensu - Polymerase Chain Reaction</i>	51

3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	52
3.6 Pesquisa de biofilme e avaliação das suas características.....	53
3.6.1 Avaliação da tolerância do biofilme de <i>S. maltophilia</i> frente a desinfetantes.....	54
3.6.2 Análises estatísticas	55
3.6.3 Caracterização do biofilme por microscopia eletrônica de varredura	55
3.7 Avaliação da capacidade agregativa	56
3.8 Avaliação das relações genéticas e características fenotípicas das linhagens ...	56
4 RESULTADOS	58
4.1 Caracterização fenotípica	58
4.2 Caracterização genotípica.....	62
4.2.1 Análise de genes rRNA	62
4.2.2 Tipificação	66
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A - ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	101
ANEXO B - RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.....	102
ANEXO C - ELABORAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA PESQUISA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATRIZ DE POLIESTIRENO E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO BIOFILME FRENTE A DESINFETANTES	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vacinação no Brasil

A história da vacinação no Brasil se inicia ainda no período imperial, motivada pelo aumento da globalização e conseqüentemente, da transmissão de doenças. Apesar do êxito da vacinação no controle da varíola e na redução significativa de mortes, a população brasileira ainda apresentava resistência a imunização voluntária. Fato que levou Dom João IV a decretar a obrigatoriedade da vacinação em todos os municípios do País por força de um decreto imperial real em 1846 (Lima et al., 2021). Essa resistência persistiu por mais de 100 anos, e em 1904, culminou na revolta da vacina, um dos acontecimentos mais importantes da história da saúde pública no País (Nogueira et al., 2021).

Mesmo após sucessivas reorganizações administrativas, sanitárias e revoltas populares ao longo dos anos (Figura 1), o Brasil se tornou referência no mundo como um dos países mais preparados para controle de doenças, tornando-se autossuficiente para produzir 54% das vacinas disponibilizadas no país (Funasa, 2017; Cortes et al., 2012; Ortiz-Prado et al., 2021).

A implantação do Programa Nacional de Imunizações (PNI) em 1975, reformou o sistema de saúde no Brasil por meio da criação do Calendário Nacional e da distribuição de vacinas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a toda população brasileira. Ao todo, são disponibilizadas mais de 20 vacinas, cuja imunização inicia-se nos recém-nascidos (Ministério da Saúde, 2023). O programa já foi responsável pela erradicação de diversas doenças em território brasileiro como varíola, poliomielite, rubéola e sarampo, tendo este último retornado depois de mais de 10 mil casos confirmados em 2018 devido à baixa adesão a vacinação, o que levou a perda do certificado de eliminação do vírus sarampo no país (Amorim et al., 2022).

A intensificação das ações para promoção da saúde brasileira através do PNI levou ao aumento considerável do consumo de vacinas no país, e visando a autonomia e o fortalecimento da produção nacional de imunobiológicos, foi criado o Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos (Pasni). Por meio do Pasni, foram investidos recursos para a recuperação de infraestruturas de laboratórios oficiais, modernização de

instalações e equipamentos, construção de novas unidades laboratoriais, capacitação profissional especializada e incentivo ao desenvolvimento de tecnologia nacional e transferência de tecnologia para produção de novas vacinas (Quadro 1) (Brasil, 2003).

Figura 1 - Principais marcos na história da vacinação no Brasil



Legenda: DTP: Difteria, tétano e pertussis, Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b.
Fonte: Fundação Nacional de Saúde (2017).

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), é a principal unidade técnico-científica responsável pela produção de biofármacos, vacinas e reativos para diagnósticos, que são disponibilizados

pelo Ministério da Saúde (MS) para a população, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2020, 2021).

Quadro 1 - Vacinas de uso humano produzidas parcialmente ou em sua totalidade em território nacional

Laboratório	Vacinas produzidas
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos)	DTP e Hib ¹ , febre amarela, meningite A e C, pneumocócica 10-valente, COVID-19 (recombinante), poliomielite inativada (1, 2 e 3), poliomielite oral (1 e 3), rotavírus humano, tríplice viral ² , tetravalente viral ³
Instituto Butantan	Influenza sazonal trivalente (fragmentada e inativada), hepatite A (inativada), hepatite B (recombinante), HPV ⁴ , raiva (inativada), DTP
Fundação Atauilpho de Paiva (FAP)	BCG ⁵
Fundação Ezequiel Dias (Funed)	Meningocócica C (conjugada)

Legenda: ¹ contra difteria, tétano, pertussis (coqueluche) e infecções graves pelo *Haemophilus influenzae* tipo b, ² contra sarampo, caxumba e rubéola, ³ contra sarampo, caxumba, rubéola e varicela, ⁴ contra papilomavírus humano, ⁵ contra tuberculose.

Fonte: A autora (2023).

O Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) do Instituto, é um dos maiores centros de produção de imunobiológicos da América Latina e permite a autonomia brasileira no setor de produção das vacinas que fazem parte do PNI (Quadro 1). O Instituto também colabora com a saúde pública internacional, atuando na contenção de doenças por meio da exportação de vacinas, como a meningocócica e febre amarela, sendo que a última citada foi pré-qualificada pela OMS desde 2001, sendo habilitada para ser adquirida pelas Agências das Nações Unidas (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2020, 2021).

Após o surgimento da pandemia causada pelo coronavírus (SARS-CoV-2) em 2020, Bio-Manguinhos deu início a projetos relacionados ao enfrentamento da emergência sanitária, por meio do desenvolvimento do *Kit* Molecular SARS-CoV-2, em parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná e o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fiocruz, o qual é capaz de detectar quantidades mínimas de material genético viral, tornando possível o diagnóstico desde o primeiro dia do aparecimento dos sintomas (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2020, 2021). Além disso, em conjunto com o MS formou uma parceria com a biofarmacêutica AstraZeneca para produzir a vacina contra o novo coronavírus desenvolvida pela Universidade de Oxford. Em 2021 o

Instituto iniciou a produção de lotes de vacinas 100% nacionalizadas, com a produção interna do insumo farmacêutico ativo (IFA) (Fundação Oswaldo Cruz, 2021).

1.2 Fabricação de imunobiológicos

De forma geral, os produtos da indústria farmacêutica podem ser divididos em duas categorias principais: estéreis e não-estéreis. Segundo a Farmacopeia Brasileira (FB), a esterilidade é definida como a ausência de microrganismo viáveis (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019). As vacinas e biofármacos que são aplicados como injetáveis, precisam ter a sua esterilidade garantida para a segurança dos pacientes. Por esses fatores, a produção brasileira de imunobiológicos é realizada por um processo industrial altamente regulamentado, o qual obedece a diversas normas e diretrizes estabelecidas nacionalmente e internacionalmente por órgãos como a OMS, Farmacopeia Europeia (EU Ph), Farmacopeia Americana (USP), FB e a *International Organization for Standardization* (ISO) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021). Além disso, todo o processo de fabricação, desde o transporte até o armazenamento dos produtos, deve ser submetido à Vigilância Sanitária, que corresponde a um conjunto de ações que visam diminuir os riscos de contaminação, de acordo com a Lei Orgânica da Saúde (Brasil, 1990). À Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) cabe a responsabilidade de regulamentar o controle e a fiscalização de produtos, desde a produção, até a exposição ao consumo, bem como dos serviços que envolvem riscos à saúde pública (Brasil, 1999).

O não cumprimento dos requisitos estabelecidos pode ocasionar em contaminações, que levarão o produto ao descarte, desencadeando prejuízo e desperdício dos materiais. As principais fontes de contaminação de produtos farmacêuticos são matérias-primas, equipamentos, reagentes, manipuladores e ambiente (Pinto; Kaneko; Pinto, 2015; Eissa, 2017; European Medicines Agency, 2019).

1.2.1 Contaminação microbiana na indústria de biológicos

Para reduzir o risco de contaminação durante o processo, a fabricação dos produtos estéreis deve ser realizada em salas limpas (World Health Organization, 2011), que são definidas como ambientes controlados capazes de reduzir a introdução, geração

e retenção de contaminantes dentro da área (Brasil, 2022^a). Essas áreas são classificadas em zonas (Grau A, B, C e D) de acordo com a criticidade da operação, apresentando diferentes limites de partículas e de controle microbiológico para cada uma delas (Quadro 2 e 3).

Quadro 2 - Concentração máxima de partículas permitidas no ar

Grau	Número máximo permitido de partículas/m ³ igual ou maiores que o tamanho tabulado			
	Em repouso		Em funcionamento	
	0,5µm	5,0µm	0,5µm	5,0µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	não definido	não definido

Fonte: Brasil (2019a).

Quadro 3 - Limites recomendados para o monitoramento microbiológico de áreas limpas durante operação

Grau	Limites recomendados para a contaminação microbiológica (valores médios)			
	Amostra volumétrica ativa (cfu/m ³)	Placas de sedimentação (diâmetro 90 mm - cfu/4 horas - tempo inferior pode ser utilizado)	Placas de contato (diâmetro 55 mm - cfu/placa)	Luva 5 dedos (cfu/luva) ¹
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

1 - O limite disposto é a especificação para a luva direita bem como a esquerda, sendo necessário na rotina o teste de ambas as luvas do operador

Fonte: Brasil (2019a).

A área de grau A é considerada uma zona de alto risco operacional, onde ocorre a preparação e o envase de produtos assépticos. O grau B corresponde a áreas circundantes às áreas de grau A, ambas devem ser monitoradas durante todo o processo. É dado grau C e D às áreas que realizam operações menos críticas, como o preparo de soluções e manuseio de materiais após a lavagem (World Health Organization, 2011; Brasil, 2019a).

Para que o limite de partículas e o controle microbiológico estejam dentro das especificações, é importante o estabelecimento de um monitoramento ambiental efetivo das áreas, dos operadores e dos equipamentos que fornecem ar limpo (Brasil, 2019a; Weber et al., 2019), assim como a avaliação da eficácia dos protocolos de limpeza e desinfecção que podem gerar variações na carga microbiana do ambiente onde são produzidos os produtos farmacêuticos (Parenteral Drug Association, 2015b; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019). Os dados coletados fornecem informações sobre alterações na taxa de recuperação de contaminação que podem ser indicativas de mudanças no estado de controle dentro do ambiente, assim como fornece dados para a avaliação de tendências, investigação de desvios e auxílio para tomada de decisões preventivas e corretivas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019; The United States Pharmacopeia, 2021).

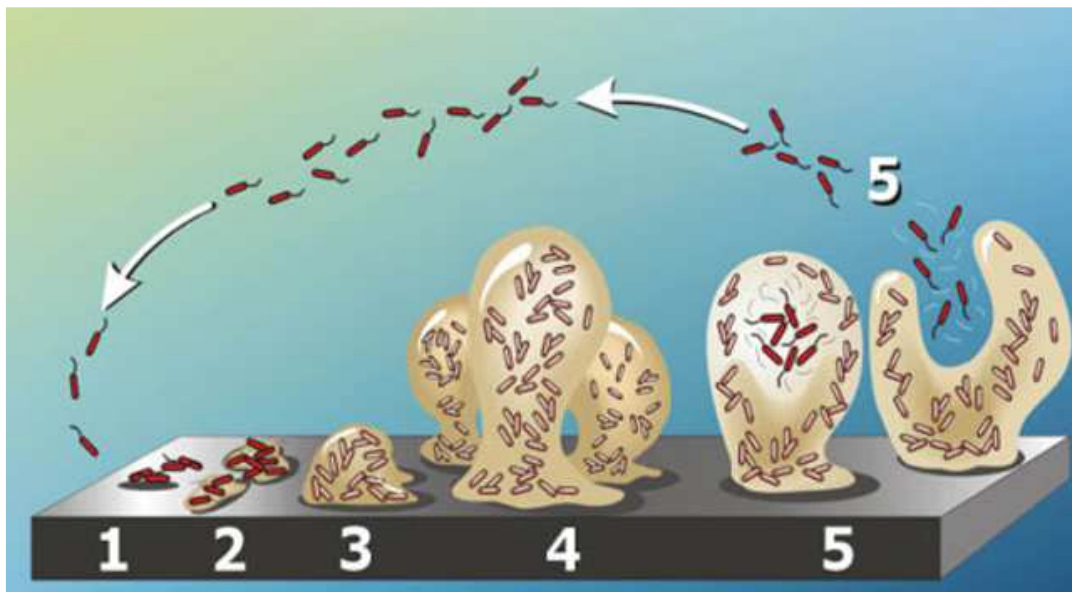
Em 2022 a *European Medicaments Agency* (EMA) publicou o Anexo 1 - Fabricação de produtos medicinais estéreis, a norma descreve que as empresas estabeleçam uma Estratégia de Controle de Contaminação: um documento contendo um conjunto planejado de ações para o controle de contaminação. Os controles em questão, não se limitam a contaminação microbiana e de partículas, mas englobam também controles de contaminação das substâncias ativas, condições operacionais de instalações e equipamentos, especificações de produtos acabados, bem como, quaisquer outros com impactos diretos ou indiretos à contaminação (European Medicines Agency, 2022).

Um dos princípios utilizados pela indústria farmacêutica para reduzir o risco de contaminações e desvios para produzir produtos de qualidade, é a implementação de um Sistema de Qualidade Farmacêutica integrado com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e o Gerenciamento dos Riscos de Qualidade (Brasil, 2022b). A avaliação de riscos consiste na identificação de potenciais fontes de contaminação microbiana por processos extrínsecos, sendo utilizada para o desenvolvimento de estratégias para o controle de todas as etapas de fabricação, minimizando a variabilidade e reduzindo a possibilidade de

contaminação e contaminação cruzada (Brasil, 2019b). Uma dessas estratégias é a adoção de limites de alerta e de ação; o primeiro corresponde a um critério que fornece um alerta para um desvio em potencial, não sendo exigida uma ação corretiva definitiva, mas que necessita de ações de acompanhamento. Já o limite de ação corresponde a um critério que caso seja excedido, exige uma ação corretiva imediata (Brasil, 2022a). Dessa forma, recomenda-se a realização de uma série de análises em várias etapas na produção para demonstrar a ausência e/ou níveis aceitáveis de contaminação (Food and Drug Administration, 2004; European Medicines Agency, 2019).

Uma das preocupações relacionadas à contaminação microbiana na indústria farmacêutica é a capacidade de alguns patógenos formarem biofilmes. Os biofilmes são formados por microrganismos que crescem agregados, geralmente ligados às superfícies bióticas e abióticas, formando uma comunidade sésil incorporada em uma substância polimérica extracelular autoproduzida (Montoya-Hinojosa et al., 2020). Esse evento é mediado pela produção de estruturas chamadas fímbrias ou *pili*, que são responsáveis pela aderência das bactérias em determinados substratos como metais e poliestireno (Oliveira-Garcia et al., 2003), estando também associadas diretamente a virulência de algumas espécies (Klemm; Schembri, 2000). O biofilme produzido oferece proteção ao microrganismo contra desinfetantes e antimicrobianos (Rabin et al., 2015; Gomes et al., 2018). Conforme o biofilme se desenvolve, microrganismos adicionais podem proliferar e se destacar da superfície (Figura 2). Esses eventos de adsorção e dessorção dos microrganismos podem explicar a variação na recuperação da biocarga frequentemente observada em vários tipos de sistemas de manuseio de fluidos na indústria farmacêutica (Parenteral Drug Association, 2015a; Mattoso et al., 2023).

Figura 2 - Processo de formação do biofilme



Legenda: 1) fixação inicial das células à superfície. 2) produção de exopolissacarídeo (EPS) e fixação das células. 3) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. 4) maturação da arquitetura do biofilme. 5) dispersão de células isoladas do biofilme.

Fonte: Stoodley et al. (2002).

Microrganismos produtores de biofilme adquirem maior resistência à ação de agentes físicos e químicos, o que pode contribuir para a prevalência desses patógenos em alguns ambientes (Parenteral Drug Association, 2015a; Vasconcellos et al., 2021b). O tempo de exposição, assim como a concentração e a frequência de limpeza com o sanitizante escolhido, são fatores importantes para a eliminação efetiva do biofilme e devem ser avaliados (Parenteral Drug Association, 2015b). Por isso, os desinfetantes utilizados na indústria farmacêutica precisam ter sua eficácia comprovada por meio de estudos.

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 700 de 13 de maio de 2022, que “Dispõe sobre produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos”, a comprovação da eficácia para o registro na Anvisa deve ser realizada mediante a metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ou métodos adotados pelo Comitê Europeu de Normatização (CEN) (Brasil, 2023). O método utilizado deve empregar os microrganismos específicos exigidos na RDC n.º 700/2023.

Para confirmar a eficácia, os programas de controle, limpeza e desinfecção precisam ser validados de acordo com a superfície, produto ou local em que estão sendo

realizados (Brasil, 2022b). Um novo estudo de eficácia deve ser realizado quando: 1) Ocorrer mudança na composição do desinfetante; 2) Ocorrer a inclusão de um novo desinfetante; 3) Ocorrer a inclusão de uma nova superfície no escopo do estudo; e 4) O controle de qualidade identificar alterações no perfil microbiológico da instalação que justifique um novo estudo de eficácia (Parenteral Drug Association, 2015b).

1.3 Controle de Qualidade

De acordo com a RDC n.º 658, de 30 de março de 2022, que “Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos”, o controle de qualidade é a unidade responsável pela coleta e especificação de amostras, execução de testes, organização da documentação de procedimentos de liberação que asseguram que os ensaios essenciais sejam realizados, e que os produtos não sejam liberados para comercialização, distribuição ou uso, até que a sua qualidade tenha sido considerada satisfatória (Brasil, 2022a).

As atividades específicas incluem: a emissão de boletins analíticos; a avaliação das condições ambientais das áreas de todo o processo produtivo; a elaboração de novas metodologias analíticas e planos de estudo de estabilidade em novos produtos; aprovar especificações, instruções de amostragem e métodos de análise; oferecimento de suporte aos diversos setores da empresa, no que se refere à qualidade dos produtos, participação em estudos e atividades de validação analítica e identificação de contaminantes (Brasil, 2022a).

Além de todos os testes de controle de qualidade realizados pelos produtores, de acordo com a RDC n.º 73, de 21 de outubro de 2008, que “Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas para consumo no Brasil”, é delegada ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz a responsabilidade pela liberação de todos os lotes de vacinas utilizadas no país (Brasil, 2008).

O Controle de Qualidade das indústrias de imunobiológicos realiza testes em cada etapa do processo de produção atendendo às exigências da Anvisa e outros órgãos internacionais. Dentre os ensaios obrigatórios que são realizados, estão os ensaios microbiológicos, os quais podem ser: qualitativos, como por exemplo o teste de

esterilidade, onde as especificações exigem que nenhum microrganismo possa estar presente na amostra (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019); ou quantitativos, como por exemplo análise de água, monitoramento ambiental e teste de biocarga, onde são quantificados os microrganismos totais (European Medicines Agency, 2019).

A identificação dos microrganismos oriundos de ensaios microbiológicos na cadeia produtiva também é necessária em diversos casos (Moreira et al., 2021; Costa et al., 2022ab).

Dentre as fontes nas quais os microrganismos são isolados, as principais, e suas definições estão citadas abaixo:

- Água potável (APO): água retirada de mananciais que foi tratada para atender as especificações exigidas. Utilizada para climatização de alguns equipamentos, etapas iniciais de limpeza e produção de água com nível de pureza mais elevado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019);
- Água purificada (APU): é a água potável que foi submetida a algum tipo de tratamento para eliminar possíveis contaminantes e capaz de atender aos limites de pureza especificados. Utilizada para preparo de soluções, reagentes, meios de cultura e diluições nas análises (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019);
- Água para injetáveis (API): produzida a partir da água purificada por destilação ou processos similares. Utilizada na preparação de produtos de uso parenteral ou lavagens de equipamentos e tubulações usados para preparações parenterais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019);
- Vapor puro: água vaporizada que quando condensada, atende todos os atributos de qualidade da água para injetáveis (The United States Pharmacopeia, 2020);
- Matéria-prima (MP): qualquer substância utilizada para produção de medicamentos, exceto os materiais de embalagem (Brasil, 2022a);
- Soluções intermediárias de processo (SIP): substância que sofre alteração molecular ou passa por purificação, obtida durante as etapas de processamento antes de transformar-se em um IFA (Brasil, 2014);
- Reagentes: substâncias utilizadas para realização de testes, reações, ensaios e soluções (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019);

- Validação de processos: procedimento para comprovar, seguindo as BPF, que qualquer processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva aos resultados esperados (Brasil, 2022a);
- IFA: substância que possui atividade farmacológica com finalidade medicamentosa utilizada para diagnóstico, alívio ou tratamento. Utilizada para benefício da pessoa na qual se administra, através da alteração ou investigação de sistemas fisiológicos ou estados patológicos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019);
- Monitoramento ambiental: programa documentado e implementado por meio de procedimentos operacionais padrões (POP), cujo objetivo é realizar um conjunto de medidas para certificar que o ambiente esteja operando dentro do estado de controle adequado, assim como, avaliar a efetividade das práticas de limpeza e desinfecção (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019);
- Biocarga: número total de microrganismos em um material (ou em uma superfície) em um determinado local por um determinado tempo (European Medicines Agency, 2019). O teste de biocarga é realizado em cada lote de solução, meio de cultura e produto antes da esterilização final que pode ser realizada por calor úmido ou filtração esterilizante (Brasil, 2019a). Como forma de redução da biocarga, a implementação de uma pré-filtração pode ser realizada antes da filtração considerada esterilizante, e o teste de biocarga quando realizado nessa fase é considerado informativo (Sandle, 2016; European Medicines Agency, 2019). Quando elevada, a biocarga aumenta o desafio do filtro esterilizante ou do processo de esterilização por calor, e pode contribuir para a geração de impurezas no produto, como por exemplo as endotoxinas produzidas pelas bactérias Gram-negativas (Food And Drug Administration, 2004).

O isolamento de microrganismos patogênicos em ensaios de biocarga, monitoramentos de águas ou ambientes nas etapas de fabricação de produtos biológicos deve ser avaliado, já que estas linhagens muitas vezes se correlacionam com contaminantes encontrados em uma falha no teste de esterilidade do produto, fornecendo informações valiosas para uma investigação (Food And Drug Administration, 2004; Vasconcellos et al., 2021a; Mattoso et al., 2023).

Existe uma grande diversidade de microrganismos que são isolados na indústria farmacêutica e a prevalência deles pode variar de acordo com a fonte e o local do

isolamento. Nos ambientes classificados como áreas limpas, o gênero *Bacillus* é descrito como um dos principais grupos bacterianos isolados, principalmente pelo fato desses microrganismos produzirem esporos (Costa et al, 2022ab). Já em sistemas de água, é frequente o isolamento de bactérias Gram-negativas produtoras de biofilme (Mazzola et al., 2006; Costa et al., 2017; Selim et al., 2020). A água é a muito utilizada na indústria farmacêutica, sendo aplicada na reconstituição e síntese de produtos, limpeza e como solvente. Dessa forma, contaminações na água podem comprometer as etapas subsequentes do processo produtivo e, possivelmente, o produto final (European Medicaments Agency, 2022).

Entre as espécies encontradas frequentemente na indústria farmacêutica, destaca-se a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, que em alguns estudos já foi isolada de amostras de ar, áreas limpas e pontos de APU pertencentes a indústrias farmacêuticas produtoras de imunobiológicos (Costa et al, 2017; Selim et al, 2020).

1.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

Atualmente, o gênero *Stenotrophomonas* possui 17 espécies: *S. maltophilia* (Palleroni, Bradbury, 1993), *S. acidaminiphila* (Assih et al., 2002) *S. bentonitica* (Sanchez-Castro et al., 2017), *S. chelatiphaga* (Kaparullina et al. 2009), *S. daejeonensis* (Lee et al., 2011), *S. geniculata* (Rudra; Gupta, 2021), *S. ginsengisoli* (Kim et al., 2010), *S. indicatrix* e *S. lactitubi* (Weber et al., 2018), *S. koreensis* (Yang et al., 2006), *S. nitritireducens* (Finkmann et al., 2000), *S. rhizophila* (Wolf et al., 2002), *S. pavanii* (Ramos et al., 2011), *S. pictorum* (Ouattara et al., 2017), *S. tumulicola* (Handa et al., 2016), *S. humi* e *S. terrae* (Heylen et al., 2007).

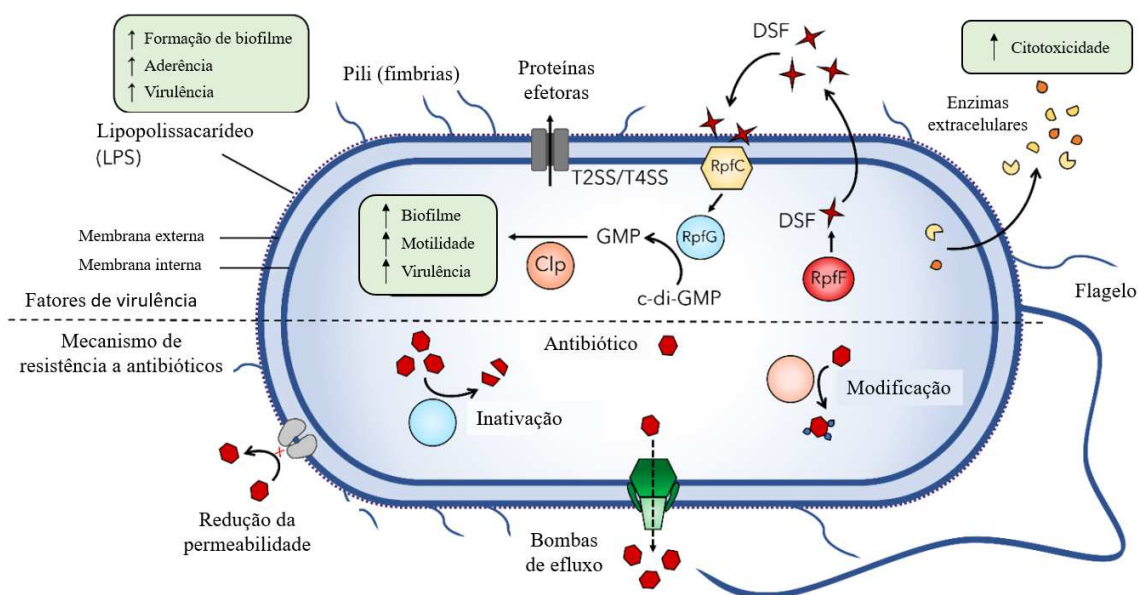
S. maltophilia é um bacilo Gram-negativo, não fermentador e pertencente à família Xanthomonadaceae. Foi primeiramente isolada como *Bacterium bookeri* em 1943 por J. L. Edwards, e foi originalmente nomeada como *Pseudomonas maltophilia* por Hugh e Ryschenko em 1961 (Hugh; Ryschenko, 1961). Em seguida, foi reclassificada no gênero *Xanthomonas* em 1983 (Swings et al, 1983), antes de ser realocada em gênero próprio em 1993, sendo classificada atualmente como *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni; Bradbury, 1993).

Bactérias da espécie *S. maltophilia* são consideradas patógenos oportunistas amplamente difundidos, e algumas linhagens podem apresentar resistência à múltiplos antimicrobianos, estando mais comumente associadas a infecções respiratórias em humanos (An; Berg, 2018; Rizek et al., 2018; Mojica et al., 2019). Em um estudo realizado pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY entre 1997 e 2001, a espécie foi a terceira bactéria Gram-negativa não fermentadora mais frequentemente isolada (Jones et al, 2003). O patógeno também foi um dos dez mais frequentemente isolados de casos de pneumonias adquiridas em hospitais em pacientes de unidades de terapia intensiva (UTI) em países ocidentais (Magill et al., 2014).

A capacidade de *S. maltophilia* utilizar diferentes fontes de carbono e tolerar ambientes pobres em nutrientes, contribuiu para a sua sobrevivência e persistência em condições ambientais diversas (Ryan et al, 2009), já tendo sido isolada de diferentes fontes como solos e raízes de plantas, animais, invertebrados, superfícies de materiais usados em cânulas intravenosas, sistemas de tratamento e distribuição de água, estações de tratamento de águas, sumidouros, lagos, rios, saladas, água para hemodiálise, água de unidades odontológicas e nebulizadores, soluções para lentes de contato e máquinas de gelo (Brooke, 2012).

A patogenicidade de *S. maltophilia* está relacionada a diversos fatores, dentre eles: 1) codificação de muitos fatores de virulência como enzimas hidrolíticas e proteínas efetoras que são liberadas da célula e que aumentam a sua citotoxicidade; 2) estruturas de superfície como lipopolissacarídeos (LPS), flagelos, *pili* e fímbrias que ajudam a bactéria a aderir a superfícies e possibilitam a formação de biofilmes resistentes a antibióticos, contribuindo para o aumento da virulência; 3) a detecção de fatores de sinal difusíveis que induzem a expressão de genes relacionados a produção de biofilme, motilidade e fatores de virulência; 4) mecanismos para o aumento de resistência a antimicrobianos, como permeabilidade reduzida de membrana, numerosas bombas de efluxo, β -lactamases, e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (Figura 3) (McCutcheon; Dennis, 2021).

Figura 3 - Patogenicidade de *S. maltophilia* e mecanismos de resistência a antibióticos



Fonte: Adaptado de McCutcheon and Dennis (2021).

1.4.1 Produção de biofilme e resistência a antimicrobianos

Alguns estudos já demonstraram que linhagens de *S. maltophilia* apresentaram resistência a metais pesados como cádmio, chumbo, cobalto, zinco, mercúrio e prata (Pages et al., 2008), assim como tolerância a desinfetantes que continham em sua composição peróxido de hidrogênio (Charoenlap et al., 2019). Outros estudos demonstraram que o biofilme produzido por *S. maltophilia* foi capaz de aderir a superfícies de plástico (Oliveira-Garcia et al., 2003). A capacidade de *Stenotrophomonas* spp. de formar biofilmes em diferentes superfícies bióticas e abióticas e de secretar várias enzimas hidrolíticas (proteases, lipases, esterases) que promovem a citotoxicidade, contribuem para sua patogênese (Pompilio et al., 2011; Karaba et al., 2013; Dumont et al., 2015; An; Berg, 2018).

Segundo a OMS, as infecções associadas à saúde causadas por bactérias resistentes são a principal causa de morte em todo o mundo. *S. maltophilia* está entre as espécies listadas nas quais a resistência é de maior preocupação para a saúde pública (World Health Organization, 2017). Um estudo demonstrou que a multirresistência de *S. maltophilia* aumentou gradualmente ao longo do período de 2004 a 2014, tendo a frequência aumentado aproximadamente dez vezes em 2014 em comparação com 2005 (Hu et al., 2018). O antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima (SXT) é considerado a

principal opção de tratamento para infecções causadas por *S. maltophilia* (Khan et al., 2021a). No entanto, os crescentes relatos de resistência a SXT são motivo de preocupação e afetam as estratégias de tratamento (Brooke, 2014; Hu et al., 2016; Madi et al., 2016), podendo levar a necessidade de uso de outros antimicrobianos como: levofloxacina (LVX), minociclina (MIN), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP) e tigeciclina (TGC) (Khan et al., 2021b).

Durante a pandemia da COVID-19 diversos estudos relataram a prevalência de *S. maltophilia* em pacientes acometidos pelo vírus. A prevalência desses microrganismos ocorre principalmente devido a sua alta habilidade em formar biofilme nos dispositivos médicos utilizados na intubação endotraqueal e ventilação mecânica que geralmente é necessária nesses pacientes (Chong, 2021; Raad et al., 2023). Ainda que os antimicrobianos não sejam eficazes para o tratamento, eles são prescritos para pacientes infectados pelo vírus por conta da dificuldade em descartar coinfeção bacteriana e por funcionarem como profilaxia contra essas infecções secundárias (Wu et al., 2022). Contudo, isso tem levado a um uso excessivo de antimicrobianos, o que é considerado preocupante, pois os pacientes ficam mais vulneráveis à sepse por infecções bacterianas secundárias por microrganismos multirresistentes (Chong, 2021).

Dessa forma, o isolamento de *S. maltophilia*, nas etapas referente à fabricação dos produtos biológicos deve ser avaliado e investigado, pois a persistência desta espécie na indústria farmacêutica está associada principalmente ao fato destes microrganismos produzirem biofilmes microbianos em superfícies (Costa et al., 2017; Selim et al., 2020).

1.5 Métodos para identificação e tipificação de bactérias

Tradicionalmente, a identificação de microrganismos inclui a avaliação morfológica da colônia (tamanho, cor, produção de pigmento), morfologia celular (bastonete, cocos, produção de esporos), técnicas de coloração e reações bioquímicas (atividade oxidase, catalase, coagulase etc.). Entretanto, os métodos tradicionais são geralmente utilizados como uma triagem primária, já que muitas vezes esses métodos não conseguem uma identificação em nível de espécie (Sutton; Cundell, 2004). A identificação das espécies pode ser útil para fins de investigação, principalmente em casos em que ocorrem a recuperação de taxas atipicamente altas ou em números que excedem

os limites recomendados para categorias específicas de produtos (Food and Drug Administration, 2004; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019; The United States Pharmacopeia, 2021). Além disso, os compêndios oficiais exigem a identificação em nível de espécie no caso de microrganismos isolados no teste de esterilidade (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019) e microrganismos isolados de áreas de Grau A e B (European Medicines Agency, 2022).

Apesar disso, a triagem primária é considerada uma etapa crítica, já que muitos métodos de identificação fenotípica dependem dos resultados que são obtidos nessa fase. Portanto, uma falha nessa identificação inicial pode levar a resultados incorretos que podem impactar na aprovação ou reprovação de produtos (The United States Pharmacopeia, 2021; Braga et al., 2022). Considerando as limitações dos métodos tradicionais, foram desenvolvidos os métodos automatizados, que podem ser divididos em dois grupos; métodos fenotípicos e métodos genotípicos (Pinto; Kaneko; Pinto, 2015).

Os métodos fenotípicos são aqueles baseados na expressão gênica do microrganismo. Esses ensaios exigem um tempo para o isolamento e crescimento microbiano, requerendo um prazo maior para a entrega de resultados. Devido ao estresse ambiental, as linhagens podem não expressar completamente suas propriedades fenotípicas, o que pode gerar variações nos resultados (The United States Pharmacopeia, 2021; Costa et al., 2022a)

Os métodos genotípicos são baseados na leitura da composição genética do indivíduo, como o sequenciamento. São considerados métodos mais confiáveis devido ao alto percentual de conservação de sequências de ácidos nucleicos na maioria das espécies microbianas (The United States Pharmacopeia, 2021). Os métodos genotípicos também podem ser utilizados para a tipificação de microrganismos, quando é necessária a identificação além do nível de espécie, como por exemplo para a avaliação e rastreamento de clones para investigações de desvios e reprovações (Versalovic et al., 1991; Maiden et al., 2013; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

1.5.1 Métodos fenotípicos

1.5.1.1 VITEK® 2

O VITEK[®] 2 é um sistema automatizado composto por testes bioquímicos miniaturizados disponíveis em cartões específicos para determinados grupos bacterianos como bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas e leveduras. A partir do preparo de uma suspensão do microrganismo isolado, o equipamento realiza o preenchimento, incubação e leitura do cartão específico. Dependendo do perfil bioquímico apresentado por cada linhagem, o programa vinculado ao equipamento confere um “bionúmero” e realiza a identificação do microrganismo associada a um nível de confiança (Biomerieux, 2022).

1.5.1.2 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) é uma técnica baseada na diferenciação de perfis proteicos para a identificação de microrganismos. A técnica consiste na combinação de uma amostra microbiana com uma matriz polimérica capaz de absorver luz em uma placa de metal condutora. No espectrômetro de massas, a placa é bombardeada por feixes de laser ultravioleta (UV) com um determinado comprimento de onda, promovendo a ionização das proteínas presentes na amostra por excitação. Os íons gerados são orientados por meio de um campo elétrico e conduzidos através de um tubo de vácuo até o detector, onde as amostras serão separadas por massa/carga segundo o tempo de voo. Cada partícula ionizada gera um pico (ou espectro) e o conjunto de partículas detectado é convertido em um perfil de espectros que é utilizado para comparar com o banco de dados presente no equipamento (Croxatto et al., 2012; Schubert; Kostrzewa, 2017; Tsuchida et al., 2020). Devido a sua simples execução, rapidez, sensibilidade e baixo custo, tem mostrado grande relevância na identificação de microrganismos (Costa et al., 2022b; Moreira et al., 2023).

1.5.2 Métodos genotípicos

1.5.2.1 Análise da sequência de genes que codificam o RNA ribossômico

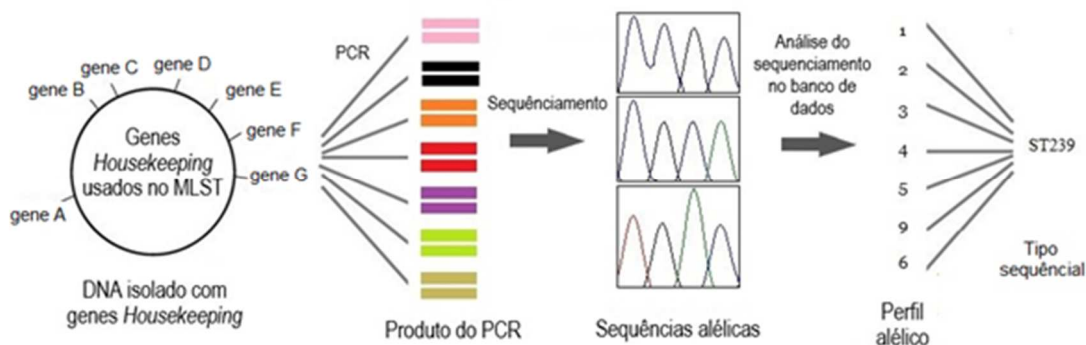
A análise da sequência de genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA), como o gene 16S rDNA, tem sido cada vez mais utilizada na identificação de espécies

bacterianas e estudos taxonômicos. Esse fato ocorre devido a sua estrutura conter regiões altamente conservadas intercaladas com nove regiões hipervariáveis, o que possibilita a utilização de iniciadores universais para a amplificação por reação em cadeia pela polimerase (PCR) de sequências alvo, permitindo a identificação de linhagens em nível de gênero e possivelmente, em nível de espécie. Além disso, existe uma grande disponibilidade de sequências desse gene em bancos de dados curados e de domínio público, permitindo a comparação das sequências com linhagens desconhecidas (Yoon et al., 2017). Entretanto, o gene 16S rDNA nem sempre é capaz de diferenciar linhagens estritamente relacionadas (Costa et al., 2022b) sendo necessário nesses casos o sequenciamento e análise de outros genes espécie-específicos, como o 23S rRNA. Esse gene tem sido utilizado como alvo de primers específicos para solucionar problemas na identificação da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* (Foster et al., 2008; Pinot et al., 2011).

1.5.2.2 *Multi-locus sequence typing*

A técnica de *Multi-locus sequence typing* (MLST) é um método baseado no sequenciamento de genes constitutivos (*housekeeping genes*). Neste método, a variação alélica em cada *locus* é catalogada e uma sequência é atribuída ao perfil formado pelo conjunto de alelos, permitindo a identificação de microrganismos em nível de linhagem por meio da definição dos tipos sequenciais (ST) (Maiden et al., 2013). Uma única diferença em um alelo, já resulta em um ST diferente. Complexos clonais (CC) são formados a partir do agrupamento de ST que possuam um determinado número ou mais *loci* em comum (Figura 4). Na análise de linhagens de *S. maltophilia*, são utilizados os genes: *atpD* (codifica a subunidade β da ATP sintase), *gapA* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *guaA* (GMP sintase), *mutM* (formamidopirimidina DNA glicolase), *nuoD* (NADH desidrogenase), *ppsA* (Phosphofenol piruvato sintase) e *recA* (proteína recA).

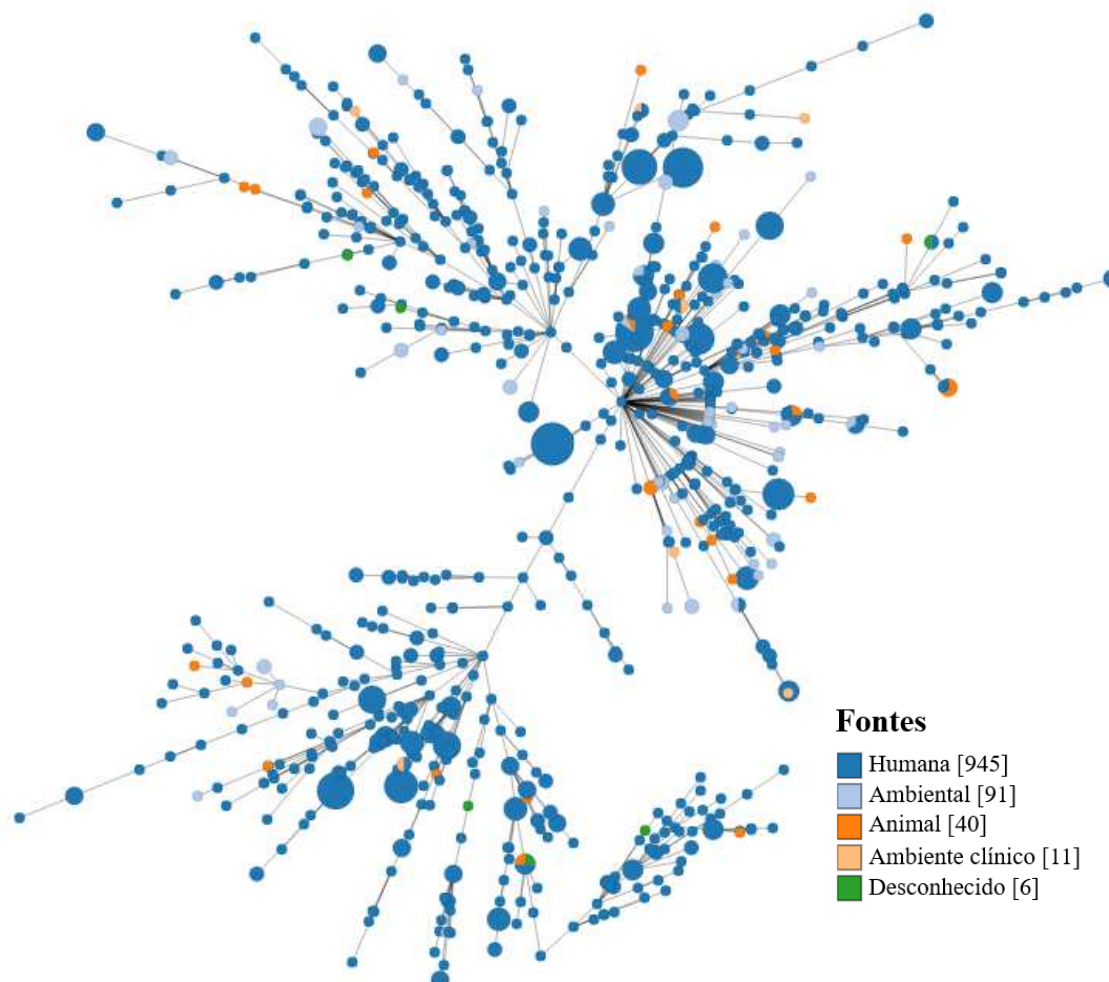
Figura 4 - Representação das etapas envolvidas na técnica do *Multi Locus Sequence Typing*



Fonte: Costa (2019).

Atualmente, o banco de dados de *S. maltophilia* possui 1.093 linhagens depositadas de *S. maltophilia* identificadas em 914 ST distintos, além de 21 linhagens pertencentes a outras espécies (<https://pubmlst.org/smaltophilia>; último acesso: 20/02/2023). As linhagens foram isoladas a partir de amostras clínicas de humanos (n=945), de origem ambiental (n=91), de animais (n=40), de ambientes de hospitais (n=11) e de origem desconhecida (n=6) (Figura 5). O Brasil possui nove linhagens depositadas, identificadas em seis ST distintos, sendo a maioria dessas linhagens oriundas de amostras clínicas de infecções de humanos (sangue, escarro e aspirado traqueal).

Figura 5 - *Minimum Spanning Tree* apresentando as relações genéticas entre as linhagens (n=1.093) depositadas no banco de dados de *S. maltophilia* no PubMLST e discriminadas de acordo com a fonte de isolamento



Legenda: As linhagens estão distribuídas de acordo com o Tipo Sequencial (ST). O tamanho do círculo é proporcional ao número de linhagens. Linhas conectando os grupos ST, indicam que eles diferem em um alelo (linha sólida espessa), ou três a cinco *locus* (linhas finas e pontilhadas).

Fonte: <https://pubmlst.org/organisms/stenotrophomonas-maltophilia>, último acesso: 20/02/2023.

1.5.2.3 *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction*

O *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR) é uma técnica baseada na amplificação de pequenas sequências repetitivas de DNA conservado, encontradas em diferentes *loci* do genoma bacteriano. A amplificação dessas regiões resulta em sequências de diferentes tamanhos que poderão ser visualizadas a partir de uma eletroforese em gel de agarose. Os padrões de bandas formados permitem a diferenciação de linhagens bacterianas intimamente relacionadas.

Foi observada pela primeira vez em linhagens de *Escherichia coli*, mas estudos posteriores revelaram a presença dessas sequências em outras espécies como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Versalovic et al., 1991).

1.6 Justificativa

A Vigilância Sanitária atua sobre diversos fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, ambientes, transportes, cargas e pessoas, visando à promoção, à proteção, à recuperação e à reabilitação da saúde (Marques; Rabelo, 2020). Dessa forma, a avaliação da qualidade de produtos imunobiológicos é de interesse da saúde e, portanto, papel da Vigilância Sanitária (Brasil, 2008).

Tendo em vista a prevalência das linhagens de *S. maltophilia* na indústria farmacêutica e o seu potencial patogênico, a caracterização fenotípica e molecular dessas linhagens se faz necessária para fins de investigação por meio da avaliação do perfil clonal, que poderá auxiliar na análise de risco, criação de medidas preventivas e tomada de decisões para eliminação destes microrganismos e liberação ou não de produtos ao longo da cadeia produtiva. Além disso, a avaliação da tolerância do biofilme de *S. maltophilia* frente a desinfetantes utilizados na indústria farmacêutica poderá contribuir para revisão de protocolos de limpeza e desinfecção.

A divulgação destes dados para a comunidade científica permitirá uma correlação entre os ST identificados nas áreas produtivas com os associados a infecções em humanos no Brasil e no mundo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar linhagens de *S. maltophilia* isoladas de uma unidade farmacêutica por meio de técnicas fenotípicas e moleculares, e verificar a formação de biofilme e sua tolerância a desinfetantes, visando a implementação de medidas de ação e controle para eliminação destas bactérias.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar linhagens de *S. maltophilia* pelo perfil bioquímico, pelo perfil proteômico, por sequenciamento genético e pela amplificação do gene 23S rDNA;
- Tipificar linhagens de *S. maltophilia*;
- Determinar o perfil de susceptibilidade das linhagens de *S. maltophilia* frente a antimicrobianos;
- Pesquisar a formação de biofilme de linhagens de *S. maltophilia* em superfícies de poliestireno e aço inox;
- Avaliar a tolerância do biofilme de *S. maltophilia* frente a desinfetantes utilizados na indústria farmacêutica em superfícies de poliestireno;
- Avaliar as características dos biofilmes formados por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a capacidade agregativa de linhagens de *S. maltophilia*.

3 METODOLOGIA

3.1 Linhagens bacterianas

Foram avaliadas 270 linhagens de *S. maltophilia* isoladas de uma indústria farmacêutica no período de 2014 a 2021. As linhagens foram isoladas de diferentes tipos de amostras coletadas durante as diversas etapas produtivas como: monitoramentos ambientais, análises de água, testes de validação de limpeza, determinação de biocarga, teste de esterilidade, entre outros. As linhagens foram criopreservadas em *skim milk* (Difco, EUA) contendo glicerol (Merck, EUA) a 30 %, e estocadas em ultrafreezer em temperatura ≤ -70 °C. As linhagens foram depositadas na Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) do IOC com número de acesso de 989 a 1027. A CBAS é afiliada no *World Federation for Culture Collections* e registrada como *World Data Centre for Microorganisms* 958 (http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_id/958).

As seguintes linhagens de referências da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas como controles ao longo dos ensaios: *E. coli* ATCC 8739, *S. maltophilia* ATCC 13637, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

3.2 Caracterização do perfil bioquímico

Os resultados do perfil bioquímico das 47 provas bioquímicas das 270 linhagens de *S. maltophilia*, previamente identificadas com um nível de confiança $\geq 89\%$ no sistema semiautomatizado VITEK[®] 2, foram compilados em forma de planilha no Programa Microsoft Excel 2013. Foram atribuídos valores numéricos a cada resultado conforme discriminado abaixo, segundo Vasconcellos et al. (2021a).

Quadro 4 - Categorização dos resultados das provas bioquímicas obtidas no VITEK[®] 2.

Resultado	Valor atribuído
+	1,00
(+)	0,75
(-)	0,25
-	0

Fonte: A autora (2023).

Posteriormente, as linhagens foram avaliadas pelo cálculo do coeficiente de similaridade utilizando a correlação de Pearson e método de *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA) com uso do *software* Bionumerics 8.1 (BioMérieux, França). Os perfis que apresentaram similaridade $\geq 85\%$ foram agrupados no mesmo *cluster* (Vasconcellos et al., 2021a).

O índice de diversidade (SI) de Simpson e seu intervalo de confiança de 95% foi calculado, o limite inferior de confiabilidade (LIC) e o limite superior de confiabilidade (LSC) foram definidos e utilizados para medir a diversidade fenotípica entre as linhagens. O cálculo estima a probabilidade de cepas não relacionadas serem classificadas em diferentes grupos (Hunter; Gaston 1988; Grundmann; Tanner, 2001).

A partir dessa análise, foram selecionadas, para aplicação de outras metodologias, 40 linhagens de *S. maltophilia* de diferentes *clusters* e perfis bioquímicos (bionúmero), fontes de isolamento, ano e locais de isolamento.

3.3 Caracterização proteômica por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*

As linhagens foram cultivadas em ágar sangue de carneiro (ASC) (BioCen, Brasil) a $(32,5 \pm 2,5)$ °C por 48 h. Após esta etapa, com auxílio de um palito de madeira, uma porção da colônia foi inoculada em duplicata nos poços (*spots*) de uma lâmina (*slide*) do modelo Flexi-Mass-DS TO-430 (BioMérieux, França). Entre cada grupo de 16 amostras, foi inserida uma porção da linhagem de *E. coli* ATCC 8739 (linhagem utilizada no controle da análise) como calibrador. Após a secagem das amostras à temperatura ambiente, foi adicionado 1,0 μ L da matriz ácido α -ciano-4-hidroxinâmico (VITEK MS-CHCA, BioMérieux, França) sobre cada *spot* utilizado. Após a cristalização da matriz, os *slides* foram introduzidos no equipamento VITEK[®] MS RUO (BioMérieux, França) e os espectros de massa gerados de acordo com o perfil proteico de cada amostra foram analisados através do *software* Saramis Premium (versão 4.0.0.14). Foram considerados como identificados apenas resultados obtidos com um percentual de similaridade $\geq 75\%$. Os resultados que estavam fora desse parâmetro foram considerados como “não identificados”, conforme recomendações do fabricante. Os espectros gerados foram

transferidos para a base de dados do equipamento e foi gerado um dendrograma para análise dos resultados.

3.4 Caracterização genotípica

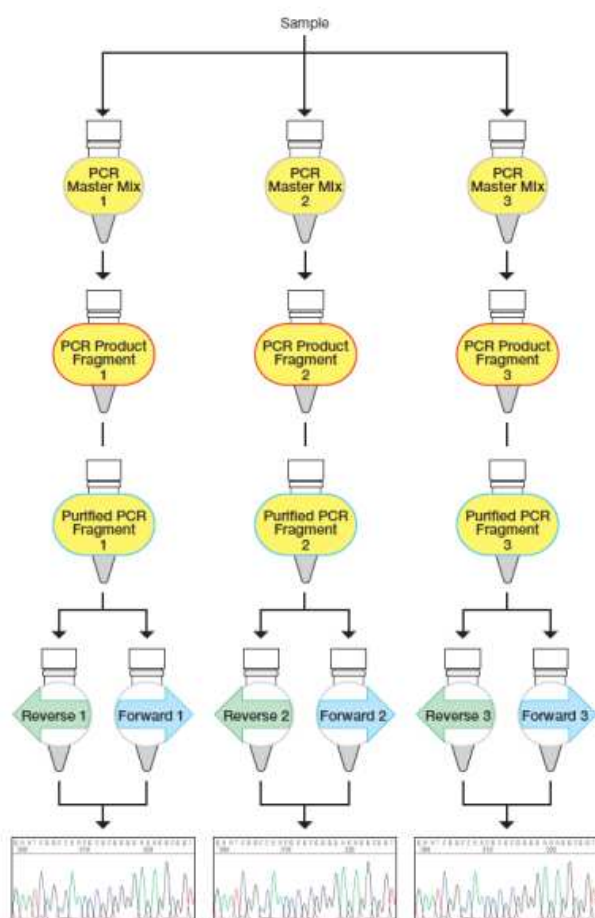
3.4.1 Sequenciamento do gene 16S rDNA

As linhagens foram semeadas em ágar caseína-soja (TSA) (Biocen, Brasil) e incubadas em estufa a $(32,5 \pm 2,5)$ °C por 48 h e identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA com uso do kit MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme as instruções do fabricante.

Para a extração do DNA, 100 µL do reagente PrepMan Ultra foram transferidos para um microtubo estéril de 1,5 mL. Em seguida, uma porção da colônia foi transferida para o microtubo, que foi agitado por 30 seg e depois aquecido a 100 °C/10 min em banho seco (Kasvi, Brasil). Posteriormente, a suspensão foi centrifugada (Eppendorf, Alemanha) na velocidade máxima da centrífuga (14.000 rpm) por 3 min, o sobrenadante foi transferido para microtubo estéril e armazenado a (-20 ± 1) °C.

O DNA extraído foi diluído na proporção 1:20 em água estéril livre de nucleases (Invitrogen, EUA). Uma alíquota de 15 µL de cada amostra (DNA diluído 1:20) foi transferida para uma placa contendo 15 µL do reagente para PCR MasterMix (Kit MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA PCR). Foram realizadas três reações de PCR para cada amostra, utilizando três reagentes PCR Master Mix (1, 2 e 3), pois cada reagente é responsável pela amplificação de uma porção do gene 16S rDNA (Figura 6). Os microtubos foram homogeneizados e acondicionados em aparelho termociclador (Life Technologies, EUA), conforme as condições de reação descritas pelo fabricante.

Figura 6 - Preparo da amostra por meio do Kit MicroSeq



Fonte: MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA Identification User Guide (2021).

Após a PCR, foi realizada a purificação do material amplificado (*amplicon*). Para isso, foram transferidos 5 μL de cada amostra para 2 tubos contendo 2 μL da enzima EXO-SAP P IT (Exonuclease 1 + Fosfatase Alcalina, Life Technologies) em cada um. Um tubo foi denominado *Foward* (F) e o outro, *Reverse* (R) para cada um dos *amplicons* (1, 2 e 3). Os tubos foram posicionados em aparelho termociclador a 37 °C / 15 min e depois a 80 °C / 15 min para inativar a enzima.

A reação de sequenciamento do material amplificado foi realizada com o kit MicroSEQ® Full Gene 16S rDNA, de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 13 μL do reagente de sequenciamento F (kit MicroSEQ® Full Gene 16S rDNA) e 13 μL do reagente de sequenciamento R (kit MicroSEQ® Full Gene 16S rDNA) nos seus respectivos tubos. Ao final, foram gerados seis tubos para cada amostra (um F e um R para cada *amplicon* obtido) com volume total de 20 μL . Os tubos foram colocados

em aparelho termociclador (Applied Biosystems, EUA) e as condições de reação foram inseridas no *software* do aparelho, conforme instruções do fabricante.

O material sequenciado foi purificado utilizando o cartucho para limpeza Microseq ID (Thermo Fischer, EUA). Para isso, foram transferidos 20 μ L do produto sequenciado para uma placa contendo as colunas de purificação acopladas a uma placa coletora embaixo. As placas foram centrifugadas (Eppendorf, A-2 DWP, Alemanha) por 5 min a 850 g e o volume (20 μ L) coletado em uma nova placa de 96 poços própria para sequenciamento (Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, foram adicionados 10 μ L de formamida (Merck, Alemanha). Os fragmentos foram separados no Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, EUA). As sequências foram analisadas através do *software* DNA Star LaserGene SeqMan (versão 7.0.0) e as sequências consenso foram depositados no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados de identificação foram obtidos por comparação com as sequências depositadas no banco de dados: EZBioCloud, versão de 07/07/2021 (<https://www.ezbiocloud.net/>) (Yoon et al., 2017).

Para a identificação das linhagens a partir do gene 16S rRNA, foram considerados como possibilidade de espécie, os resultados que apresentaram um percentual de identificação $\geq 98,7\%$ (Yoon et al., 2017). Os resultados que apresentaram mais de uma espécie como possibilidade de identificação dentro de um mesmo gênero, foram considerados como identificados em nível de gênero.

As sequências das linhagens: *S. maltophilia* MTCC 434 (número de acesso JALV01000036), *Stenotrophomonas lactitubi* M15 (número de acesso LT222224), *Stenotrophomonas indicatrix* WS40 (número de acesso KJ452162), *Stenotrophomonas pavanii* DSM 25135 (número de acesso LDJN01000038), *Stenotrophomonas geniculata* ATCC 19374 (número de acesso AB021404), *Stenotrophomonas chelatiphaga* DSM 21508 (número de acesso LDJK01000058), *Stenotrophomonas tumulicola* T5916-2-1b (número de acesso LC066089), *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7 (número de acesso LT622838), *Stenotrophomonas rhizophila* DSM 14405 (número de acesso CP007597), *Luteimonas huabeiensis* HB2 (número de acesso JAAN01000045), *Luteimonas aquatica* RIB1-20 (número de acesso EF626688), *Luteimonas marina* FR1330 (número de acesso EU295459), *Xanthomonas maliensis* M97 (número de acesso KF992843), *Xanthomonas prunicola* CFBP 8353 (número de acesso MG523312) e *P. aeruginosa* JCM 5962

(número de acesso BAMA01000316) foram incluídas para avaliar as relações filogenéticas destas espécies com as linhagens identificadas no presente estudo. A árvore filogenética baseada em alinhamentos múltiplos de sequências do gene 16S rRNA foi construída usando o *Neighbor-joining* e o algoritmo ClustalW com o software MEGA 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021) empregando o modelo Kimura de dois parâmetros (Kimura, 1980) com suporte de ramo baseado em 1.000 réplicas bootstrap.

3.4.2 Análise do gene 23S rRNA

As 40 linhagens selecionadas para este trabalho e as linhagens de *S. maltophilia* ATCC 13637, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *A. baumannii* ATCC 19606 foram semeadas em TSA e incubadas a $(32,5 \pm 2,5)$ °C / 48 h para confirmação da pureza.

Posteriormente, as linhagens tiveram o seu DNA extraído por meio do Kit Prep Man Ultra conforme descrito no item 3.4.1. A identificação por meio da amplificação do gene 23S rDNA foi realizada conforme descrito por Whitby et al. (2000), amplificando um fragmento de 531 pares de base (pb) e utilizando os iniciadores SM1 (5'-CAGCCTGCGAAAAGTA-3') e SM4 (5'-TAAGCTTGCCACGAACAG -3'). A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de 1,5% de agarose, utilizando o corante GelRed (Biotium, California, USA), em tampão Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1 X (Bio-Rad, California, USA) por 90 min a 60 V. Como marcador de peso molecular foi utilizado o peso 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen, Massachusetts, EUA). O resultado foi visualizado por meio do sistema de foto documentação iBRIGHT™ CL1500 IMAGING SYSTEM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

As linhagens selecionadas para o sequenciamento do gene 23S rDNA tiveram o seu produto da PCR purificado com EXO-SAP IT (Exonuclease 1 + Fosfatase Alcalina, Life Technologies). Posteriormente, o sequenciamento foi realizado utilizando o kit BigDye Terminator Ready Reaction Mix v.3.1 (Applied Biosystems, EUA) no Analisador Genético 3500 (Applied Biosystems, EUA) com os mesmos iniciadores utilizados na amplificação na concentração de 1,6 pmol/μL. O material sequenciado foi purificado utilizando o kit EdgeBio Performa® DTR (Edge BioSystems, EUA) e os fragmentos foram separados no Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, EUA). As análises dos cromatogramas foram realizadas utilizando o *software* 709

(Inform Technologies Inc., Shingle Springs, CA, EUA), os resultados da identificação foram obtidos na *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) utilizando a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e as sequências foram depositadas no NCBI.

3.4.3 Tipificação por *Multi-locus sequence typing*

O DNA das linhagens foi extraído a partir de cultivo em placas de ASC incubadas a $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ / 48 h utilizando o kit comercial Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem de DNA foi realizada com auxílio do equipamento Quibit (Thermo Fischer, EUA) para ajuste da concentração (5 a 20 ng/ μL). O DNA extraído foi estocado a $(-20 \pm 10) ^\circ\text{C}$ até o momento do uso. Para a determinação dos ST, os sete genes *housekeeping* (*atpD*, *gapA*, *guaA*, *mutM*, *nuoD*, *ppsA* e *recA*) foram amplificados e as amostras foram inseridas no termociclador (Applied Biosystems) de acordo com as condições disponibilizadas pelo banco de dados (Quadro 5).

Quadro 5 - Protocolo de reação para PCR de *S. maltophilia* usado na tipificação por *Multi-locus sequence typing*

Reagente	Volume (μL)	Condições de amplificação		
Tampão [10 X] ^a	1,5	Temperatura ($^\circ\text{C}$)		
Takara [5 U/ μL] ^a	0,125	95		
Primer F [10 pmol/ μL] ^b	1,0	9 min		
Primer R [10 pmol/ μL] ^b	1,0	30 vezes	94	
dNTP [2,5 mM] ^a	2,0		Δt^c	20 seg
H ₂ O RNase free ^a	14,375		72	1 min
DNA molde [5-20 ng/ μL]	5,0	72		
Volume total	25 μL	50 seg		
		5 min		

Legenda: ^a-Thermo Fischer, EUA; ^b-IDT, EUA; ^c- Variou conforme o quadro 6.

Fonte: A autora (2023).

Para verificar o tamanho do fragmento de DNA amplificado em pb, foi realizado uma PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR>) utilizando os iniciadores disponibilizados pelo banco de dados PubMLST. Para verificar a pureza, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Thermo Fisher, EUA) a 1,0% a 60 V/60 min com a aplicação de corante fluorescente de ácidos nucleicos ultrasensível (GelRed[®],

Thermo Fischer, EUA) e peso molecular 1 kb (Thermo Fischer, EUA). Para visualização do *amplicon* foi utilizado o sistema de foto documentação L-PIX Touch (LOCCUS, Brasil). A purificação do material amplificado foi realizada com o reagente ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Thermo Fischer, EUA). Os iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento estão descritos no Quadro 6.

Quadro 6 - Sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos oriundos da amplificação dos genes do *Multi-locus sequence typing* para *S. maltophilia*

Gene	Iniciadores (5' → 3')	Anelamento (°C)	Produto (pb)
<i>atpD</i>	F – ATG AGT CAG GGC AAG ATC GTT C	62	854
	R – TCC TGC AGG ACG CCC ATT TC		
<i>gapA</i>	F – TGG CAA TCA AGG TTG GTA TCA AC	62	800
	R – TTC GCT CTG TGC CTT CAC TTC		
	F – AGG AGC TTG AGA AAT GGC AA ¹	48 - 58	975
	R – GAG TAG CCC CAC TCG TTG TC ¹		
<i>guaA</i>	F – AAC GAA GAA AAG CGC TGG TA	62 ²	700
	R – ACG GAT GGC GGT AGA CCA T		
<i>mutM</i>	F – AAC TGC CCG AAG TCG AAA C	58 - 62 ²	614
	R – GAG GAT CTC CTT CAC CGC ATC		
	F – AAC TGC CCG AAG TCG AAA C ¹	48 ² – 52	562
	R – TTA CCG GCC TCG CGC AG ¹		
	F – GAAGTCGAAACCACCCG ³	48 - 58	524
	R – GCCTTGAACAGGCTCTC ³		
<i>nuoD</i>	F – TTC GCA ACT ACA CCA TGA AC	48	514
	R – CAG CGC GAC TCC TTG TAC TT		
	F – AGG AAA TCC GCA ACT ACA CC ¹	48	519
	R – AGC GCG ACT CCT TGT ACT TC ¹		
<i>ppsA</i>	F – CAA GGC GAT CCG CAT GGT GTA TTC	62	612
	R – CCT TCG TAG ATG AA(A/G) CCG GT(A/G) TC		
	F – TTC ACC CTG GAC ACC GAG T ¹	58	883
	R – CGA AGT CGA AGG CAC GTT ¹		
<i>recA</i>	F – ATG GAC GAG AAC AAG AAG CGC	62	783
	R – GGT GAT GAC CTG CTT GAA CGG		

Legenda: iniciador forward (F); iniciador reverse (R); iniciadores alternativos ⁽¹⁾; temperatura utilizada na presença de betaína 1,3 M ⁽²⁾ (Merck, Alemanha); iniciadores desenhados para o presente estudo ⁽³⁾.

Fonte: <http://pubmlst.org/smaltophilia/>. Acesso em: 14/03/2022.

O sequenciamento foi realizado utilizando o kit BigDye Terminator Ready Reaction Mix v3.1 (Applied Biosystems, EUA) (Quadro 7) no Analisador Genético 3500 (Applied Biosystems, EUA).

Quadro 7 - Protocolo de reação de sequenciamento de *S. maltophilia* dos produtos oriundos da amplificação dos genes do *Multi-locus sequence typing*

Reagente	Volume	Condições do sequenciamento	
Tampão 5X ^a	1,5 µL	Temperatura	Tempo
Iniciador (1,6 pmol) ^b	2,0 µL	96 °C	10 seg
Big Dye ^a	1,0 µL	50 °C	5 seg
DNA purificado	5,5 µL	60 °C	4 min
Volume total	10 µL	25 vezes	

Legenda: ^a-Thermo Fischer, EUA; ^b-IDT, EUA.

Fonte: A autora (2023).

O material sequenciado foi purificado utilizando o kit EdgeBio Performa® DTR (Edge BioSystems, EUA). Para tal, a placa fornecida pelo kit (Performa 96-Well Plate), que contém as colunas para a purificação do material, foi acoplada a uma placa descarte e centrifugada por 3 min a 850 g para desidratação. Em seguida, foram transferidos 10 µL do material sequenciado para a Performa 96-Well Plate acoplada a uma nova placa. Os fragmentos foram separados no Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, EUA) e as análises dos cromatogramas foram realizadas utilizando o *software* BioEdit 709 (Informer Technologies Inc., Shingle Springs, CA, EUA) e os alelos e ST foram determinados por meio das ferramentas disponíveis no banco de dados (www.pubMLST.org/smaltophilia).

3.4.4 Tipificação pela técnica de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction*

Para tipificação das linhagens de *S. maltophilia* foi utilizada a metodologia descrita por Versalovic et al. (1991), utilizando o iniciador ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de 1,5% de agarose, utilizando o corante GelRed (Biotium, California, USA), em TAE 1 X (Bio-Rad, California, USA) por 90 min a 60 V. Como marcador de peso molecular foi utilizado o peso 1 kb plus DNA Ladder

(Invitrogen, Massachusetts, EUA). O gel foi fotografado e analisado utilizando-se sistema de foto documentação iBRIGHT™ CL1500 IMAGING SYSTEM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os padrões de bandas foram analisados com uso do Programa BioNumerics versão 8.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). O dendrograma foi construído com índice de Dice e o método UPGMA (Van Belkum et al., 2007).

O SI de Simpson e seu intervalo de confiança de 95% foi calculado, o LIC e o LSC de confiabilidade foram definidos e utilizados para medir a diversidade fenotípica entre as linhagens. O cálculo estima a probabilidade de cepas não relacionadas serem classificadas em diferentes grupos (Hunter; Gaston 1988; Grundmann; Tanner, 2001).

3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

As linhagens de *S. maltophilia* foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos por meio do método de disco difusão em ágar, seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Para cada linhagem, foram preparadas suspensões bacterianas ajustando a turvação para 0,5 na escala de McFarland. As suspensões foram semeadas em ágar Muller Hinton (Oxoid, Inglaterra) e incubadas a $(35 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ / 24 h. Foram testados os antimicrobianos (Sartorius, Alemanha) nas seguintes concentrações: minociclina (MIN; 30 μg), levofloxacin (LVX; 5 μg) e sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 1,25/23,75 μg). Após o período de incubação, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado e as linhagens foram classificadas como: sensível, resistência intermediária ou resistente de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2020).

A determinação da concentração inibitória mínima (CMI) foi realizada utilizando o E-test (Liofilchem, Via Scozia, Itália), que se baseia na utilização de fitas impregnadas com concentrações pré-definidas de antibióticos, formando um gradiente. Foram preparadas suspensões de cada linhagem com turvação de 0,5 na escala de McFarland e semeadas em ágar Muller Hinton (Oxoid, Inglaterra). Posteriormente, a tira Teste Liofilchem® MIC foi transferida para o meio com auxílio de uma pinça. As placas foram incubadas a $(35 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ por 24 h e após esse período, foi realizada a leitura do ponto de inibição. As linhagens foram classificadas como: sensível, resistência intermediária ou resistente de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2020).

3.6 Pesquisa de biofilme e avaliação das suas características

Para a pesquisa de formação de biofilme foram realizados três experimentos independentes em triplicata para cada linhagem, de acordo com o protocolo descrito por Umeda et al. (2017). A formação de biofilme foi avaliada em microplaca de poliestireno de 96 orifícios com fundo chato (Corning, USA), tendo como substrato o caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha).

As linhagens previamente criopreservadas foram semeadas em TSA e incubadas a $(35 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ / 24 h para confirmação da pureza. Uma colônia isolada de cada linhagem foi semeada em um tubo 13 x 100 mm contendo 3 mL de BHI e incubadas a 37°C / 24 h. Após o período de incubação, 200 μL do crescimento bacteriano foram semeados, em triplicata, em duas microplacas. Foi utilizado como controle positivo a linhagem de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e negativo o BHI, também utilizados em triplicata, nas duas microplacas. Uma microplaca foi incubada na temperatura de $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ e a outra a $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. A temperatura de $22,5^\circ\text{C}$ simula uma temperatura próxima a do ambiente e muito comum as áreas de produção de imunobiológicos. A temperatura de 37°C simula a temperatura ótima de crescimento das bactérias avaliadas. Após o período de 48 h de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado. As placas foram lavadas cinco vezes com água destilada e mantidas à temperatura ambiente até a completa secagem (aproximadamente 45 min). Posteriormente, foram adicionados 200 μL de solução cristal violeta 0,41% (Merck, Alemanha) em cada poço e as microplacas foram mantidas em temperatura ambiente por 45 min. Os poços foram aspirados e as microplacas lavadas cinco vezes com água destilada e mantidas em temperatura ambiente até a completa secagem. Em seguida, foram adicionados 200 μL de etanol absoluto 96% (Merck, Alemanha) em cada poço e as microplacas foram mantidas sob agitação em aparelho agitador de placas. Após 10 min, 150 μL do conteúdo de cada poço foram transferidos para novas microplacas e foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) em aparelho espectrofotômetro (Biomérieux, Reader 270, France) em comprimento de onda de 600 nm.

A interpretação dos resultados foi realizada pela média das três leituras obtidas nos três experimentos independentes. Cada linhagem foi classificada em cada

experimento da seguinte forma: não aderente (NA, atribuído valor “0”), fracamente aderente (FA, atribuído valor “1”), moderadamente aderente (MA, atribuído valor “2”) e fortemente aderente (FMA, atribuído valor “3”), segundo os critérios descritos por Stepanovic et al. (2007) (Quadro 8). O resultado final de cada linhagem foi considerado como a mediana dos resultados obtidos nos três experimentos independentes.

Quadro 8 - Critérios para classificação do biofilme

Classificação do biofilme	Resultado
Não aderente (NA)	$D.O.^a \leq D.O.^{CN}$
Fracamente aderente (FA)	$D.O.^{CN} < D.O.^a < 2 \times D.O.^{CN}$
Moderadamente aderente (MA)	$2 \times D.O.^{CN} < D.O.^a < 4 \times D.O.^{CN}$
Fortemente aderente (FMA)	$4 \times D.O.^{CN} < D.O.^a$

Legenda: DO: Densidade óptica; a: amostra; CN: controle negativo.

Fonte: Stepanovic et al., 2007.

3.6.1 Avaliação da tolerância do biofilme de *S. maltophilia* frente a desinfetantes

As linhagens que foram classificadas como MA ou FMA foram selecionadas para avaliação da tolerância do biofilme segundo o protocolo descrito por Vasconcellos et al. (2021b). Foram avaliados três desinfetantes utilizados na indústria farmacêutica onde as linhagens foram isoladas, conforme tempo de exposição e concentrações validadas nos protocolos de limpeza (Quadro 9). As linhagens que não apresentaram redução da formação do biofilme após o contato com o desinfetante, foram submetidas a um novo experimento utilizando concentrações maiores do desinfetante testado.

Quadro 9 - Desinfetantes utilizados para avaliação da tolerância do biofilme de linhagens de *S. maltophilia*

Desinfetante	Concentração (%)	Tempo de exposição
Álcool etílico	70	15 min
Hipoclorito de sódio	0,1; 0,5; 1; 2 e 2,5	15 min
Quaternário de amônio	0,05 e 0,08	20 min

Fonte: A autora (2023).

As linhagens foram cultivadas segundo a metodologia descrita no item 3.7 com a diferença que, após o crescimento de 48 h em BHI nas microplacas, antes da etapa de

coloração com cristal violeta, os poços foram tratados com 300 µL dos respectivos desinfetantes nas concentrações e intervalos de tempo avaliados. Após o tratamento, as placas foram lavadas, coradas, eluidas, e a DO mensurada.

3.6.2 Análises estatísticas

Diferenças no grau de formação do biofilme em relação à temperatura de incubação e após tratamento com o respectivo biocida foram avaliados pelo teste de Friedman, seguido do teste de Wilcoxon utilizando o software R Project (versão 3.4.3). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.6.3 Caracterização do biofilme por microscopia eletrônica de varredura

As linhagens identificadas como *S. maltophilia* foram selecionadas para a caracterização do biofilme por MEV, de acordo com metodologia descrita por Costa et al. (2021). As linhagens foram semeadas em ASC para verificação da pureza. Posteriormente, uma colônia foi transferida para um tubo (Falcon®, EUA) contendo 15 mL de BHI e incubada sob agitação de 150 rpm a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}/24$ h. Após o período de incubação, 4,0 mL do crescimento bacteriano foram transferidos para uma placa de poliestireno de 6 poços (Corning®, New York, USA) contendo um carreador de inox de 15mm Ø. As placas foram incubadas a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}/48$ h. O conteúdo das placas foi aspirado e lavado por 2 vezes com tampão PBS (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA) e foram adicionados 3 mL de em cada poço de solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5 % (Sigma, Missouri, EUA) e ferrocianeto de potássio 0,8 % (Sigma, Missouri, EUA) por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EUA) por 40 min e desidratado em concentrações crescentes de etanol (15, 30, 50, 70, 90, 100%) por 15 min cada etapa. O material foi submetido ao aparelho de ponto crítico para secagem e recoberto com ouro (20 nm de espessura) utilizando um metalizador (Leica-Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As amostras foram analisadas com o microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390 (Tokyo, Japão). O procedimento foi realizado com apoio do Laboratório de Ultraestrutura Celular do IOC da Fiocruz.

3.7 Avaliação da capacidade agregativa

A avaliação da capacidade agregativa foi realizada utilizando a metodologia descrita por Umeda et al. (2017). As linhagens foram semeadas em TSA e incubadas a $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C} / 24 \text{ h}$ para confirmação da pureza. Uma porção da colônia foi semeada em dois tubos cônicos de 15 mL (Falcon[®], EUA) contendo 5 mL de BHI. Os tubos foram incubados a $(37 \pm 2,0) ^\circ\text{C}/48 \text{ h}$, um tubo sob agitação (150 rpm) e o outro tubo sem agitação. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 1 h antes da leitura do experimento. A capacidade agregativa foi determinada visualmente pelo volume de sedimento depositado no fundo do tubo de acordo com os critérios descritos no quadro 10.

Quadro 10 - Critérios para classificação da capacidade agregativa de linhagens de *S. maltophilia*

Classificação da capacidade agregativa	Volume do sedimento (mL)
Não agregativa	< 0,1
Fracamente agregativa	0,1 mL ≤ sedimento < 0,2 mL
Moderadamente agregativa	0,2 mL ≤ sedimento < 0,3 mL
Fortemente agregativa	0,3 mL ≤ sedimento

Fonte: Umeda et al. (2017).

3.8 Avaliação das relações genéticas e características fenotípicas das linhagens

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando os sete genes concatenados para a construção de uma árvore filogenética *Neighbor-joining* no programa BioNumerics versão 8.1 (BioMérieux, país). A relação entre os ST e os CC identificados e as características fenotípicas foi determinada utilizando a ferramenta *Minimum-spanning tree* com uso do programa Bionumerics versão 8.1 (BioMérieux, França). Os STs identificados nesse estudo também foram comparados com linhagens de origem clínica depositadas nos bancos de dados utilizando o *Grape Tree* (Zhou et al, 2018) utilizando o coeficiente de categorização e visualização da ferramenta MST no pubMLST.

Também foi realizada uma análise do compartilhamento de alelos entre as linhagens avaliadas no presente estudo com o banco de dados com uso do algoritmo

eBURST (Feil et al., 2004). As sequências dos genes do MLST foram concatenadas (3.951 pb) e analisadas utilizando o algoritmo *maximum likelihood* do programa MEGA 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021) com 1000 réplicas *bootstrap*.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica

O perfil fenotípico resultante dos 47 testes bioquímicos das 270 linhagens no sistema VITEK[®]2, resultou em 60 perfis fenotípicos distintos codificados de I-LX. Os perfis mais frequentes foram: XI (63; 23,30%), III (39; 14,40 %), XIII (16; 5,90%), XX (16; 5,90%), XLII (13; 4,80%) e XVII (13; 4,80%). A partir da análise de similaridade, foram identificados oito *clusters* e três *singletons* (Tabela 1). O índice de Simpson calculado foi de 0,909, com LIC = 0,887 e LSC = 0,931.

Tabela 1 - Resultado da análise de similaridade dos perfis bioquímicos obtidos a partir das 47 provas bioquímicas do VITEK[®]2

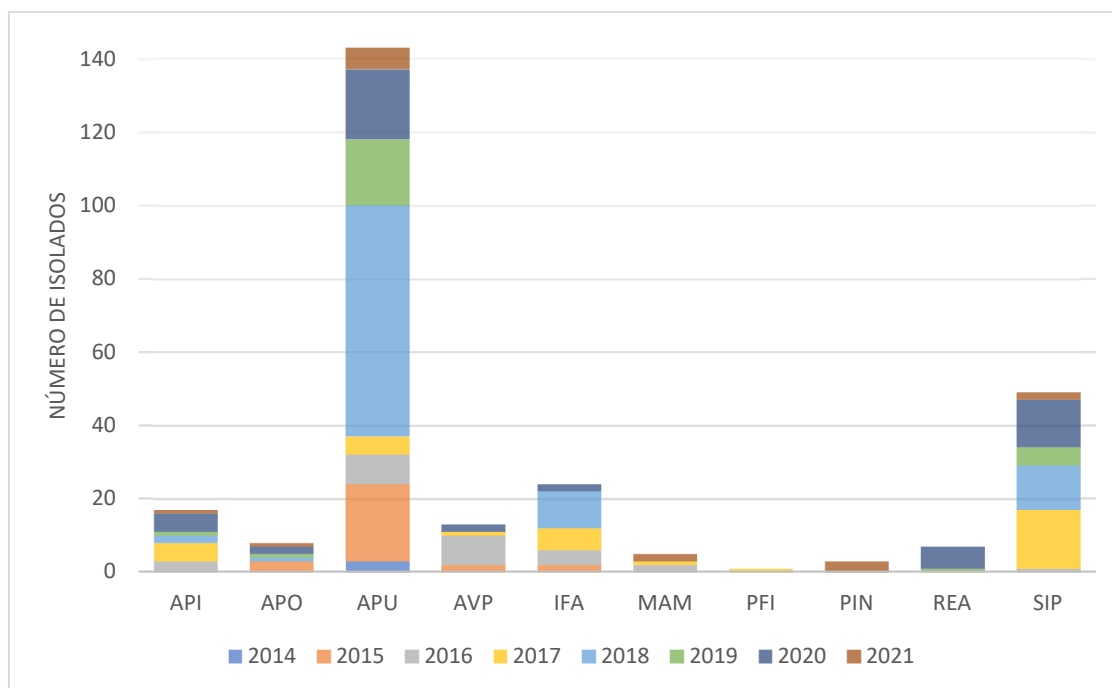
<i>Cluster</i>	Perfil bioquímico	Linhagens (n)	Similaridade^a (%)
1	I, II, XXXVI, XXXIX, XLIII, LI, LII e LIII	24	86,89
2	XLIV e XLVI	2	90,21
3	V, XII, XIII, XVII, XX, XXXIII, XXXIV, XLI, XLVII, XLVIII, L, LIV e LV	67	85,44
4	III, VII, XI, XVIII, XIX, XXV, XXVI, XXVII, XXIX, XXX, XXXV, XXXVIII, XLII, XLV e XLIX	133	86,82
5	IV, VIII, IX, X, XV, XVI e XXVIII	22	86,99
6	XIV, XXXI, XXXII, LIX, LVI, LVII e LX	11	87,31
7	XXI e XXII	3	91,45
8	VI, XXIII e LVIII	3	87,58
<i>Singleton 1</i>	XL	1	-
<i>Singleton 2</i>	XXXVII	3	-
<i>Singleton 3</i>	XXIV	1	-

Legenda: A similaridade das linhagens foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de similaridade utilizando a correlação de Pearson e método de *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA) com uso do *software* Bionumerics 8.1 (BioMérieux, França).

Fonte: A autora (2023).

As linhagens foram isoladas de água purificada (143; 53,00%), SIP (49; 18,10%), IFA (24; 8,90%), API (17; 6,30%), validação de processo (13; 4,80%), APO (8; 3,00%), reagentes (7; 2,60%), monitoramento ambiental (5; 1,80%), produto intermediário (3; 1,10%) e produto final (1; 0,40%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Fontes de isolamento das 270 linhagens de *S. maltophilia* isoladas durante o período de 2014 a 2021



Legenda: água purificada (APU); água potável (APO); água para injetáveis (API); reagentes (REA); validação de processo (AVP); monitoramento ambiental (MAM); solução intermediária de processo (SIP), insumo farmacêutico ativo (IFA), produto final (PFI) e produto intermediário (PIN).

Fonte: A autora (2023).

Após essa análise, foram selecionadas 40 linhagens de *S. maltophilia* de diferentes perfis, fonte de isolamento, ano e local para as outras metodologias realizadas neste trabalho (Tabela 2).

Tabela 2 - Linhagens de *S. maltophilia* (n=40) selecionadas para este estudo

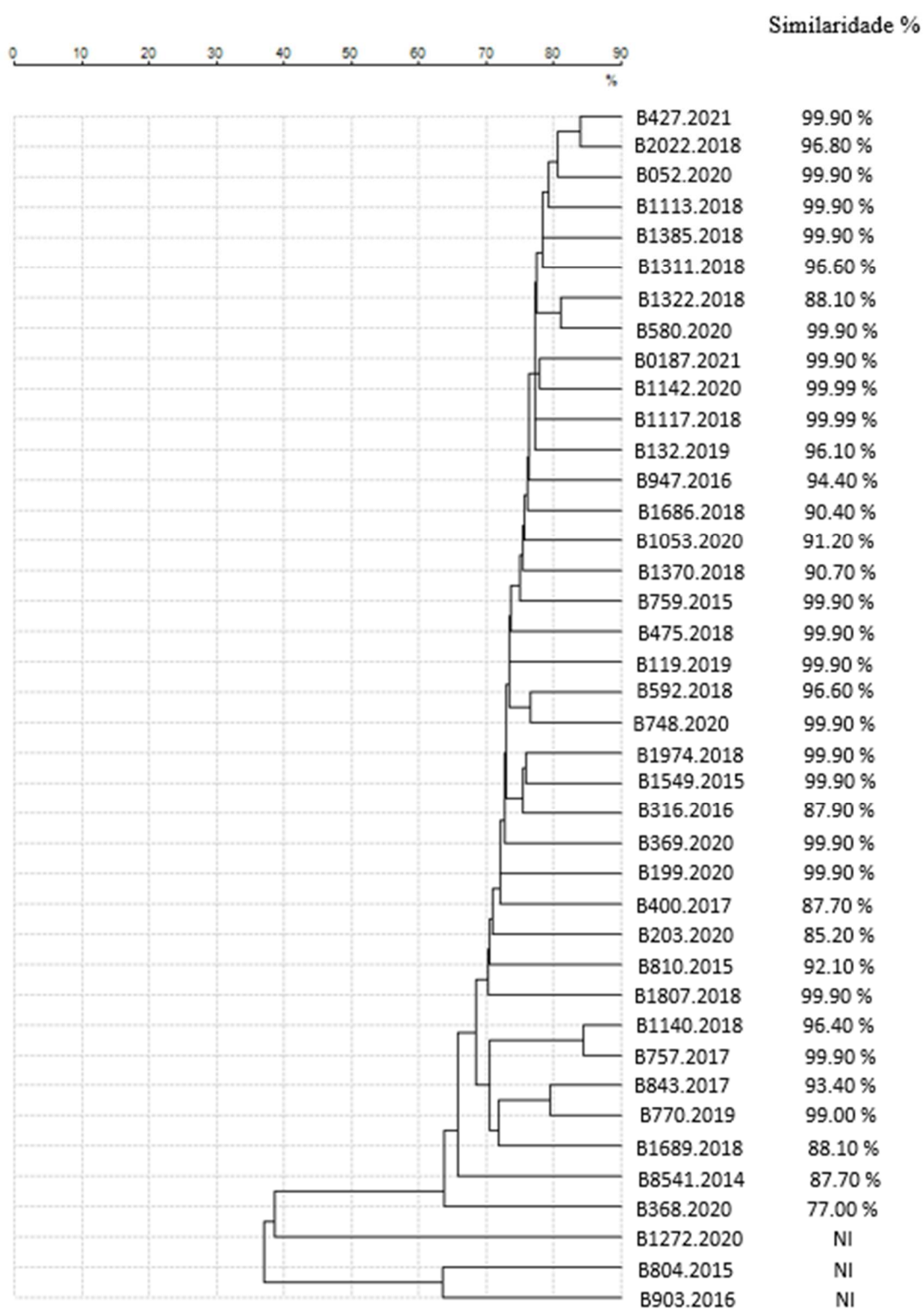
Identificação	Bionúmero	Perfil	Origem
B369.2020 e B8541.2014	1022103003764020	II	SIP; APU
B1974.2018, B199.2020, B1272.2020, B0187.2021, B316.2016 e B475.2018	1002103001740000	III	APU; APU; API; APU; APU; IFA
B804.2015	1002103001440020	IV	APU
B759.2015	1002143003540020	V	APO
B1113.2018, B1140.2018 e B810.2015	1002103001140020	IX	APU; IFA; APU
B1549.2015	1002103001440000	X	APU
B592.2018, B1370.2018, B1686.2018, B1807.2018, B119.2019 e B947.2016	1002103001740020	XI	IFA; APU; APU; APU; APU; APU
B1311.2018, B132.2019 e B1142.2020	1022103001540020	XVII	APU; APU; REA
B1117.2018	1002103001640020	XVIII	APU
B1053.2020	1022103003540020	XX	REA
B903.2016	1002003001140000	XXIII	AVP
B400.2017	1002103001540000	XXXI	IFA
B757.2017	1002101003540020	XXXIII	SIP
B580.2020, B748.2020 e B843.2017	1022103003740020	XXXV	APU; AVP; IFA
B368.2020	1022103003760020	XXXIX	SIP
B1322.2018, B1385.2018 e B1689.2018	1022103001740020	XLII	APU; APU; APU
B770.2019	1022103003744020	XLIII	API
B2022.2018	1022303001764020	XLVI	APU
B052.2020	1022103001544020	L	IFA
B203.2020	1022103003764000	LII	SIP
B427.2021	1022103001744020	LX	API

Legenda: água purificada (APU); água potável (APO); água para injetáveis (API); reagentes (REA); amostra de validação de processo (AVP); solução intermediária de processo (SIP) e insumo farmacêutico ativo (IFA).

Fonte: A autora (2023).

Das 40 linhagens selecionadas, 37 (92,50%) foram identificadas em nível de espécie como *S. maltophilia* pela técnica MALDI-TOF MS. As linhagens B804.2015, B903.2016 e B1272.2020 não foram identificadas (Figura 7).

Figura 7 - Dendrograma do perfil proteômico das 40 linhagens de *S. maltophilia* selecionadas para este estudo



Fonte: A autora (2023).

4.2 Caracterização genotípica

4.2.1 Análise de genes rRNA

As sequências obtidas através do sequenciamento do gene 16S rRNA foram comparadas com o banco de dados EzBioCloud e os resultados da identificação tiveram a sua classificação taxonômica verificada no website bacterio.net (Parte et al, 2020). A partir dessa análise foram obtidas: uma (2,50 %) identificação em nível de espécie e 39 (97,5 %) identificações em nível de gênero (Tabela 3).

A linhagem B1272.2020 foi identificada em nível de espécie como *Luteimonas huabeiensis*. Trinta e nove linhagens foram identificadas em nível de gênero como *Stenotrophomonas* spp., entretanto, as linhagens B804.2015 e B903.2016 não apresentaram como possibilidade a espécie *S. maltophilia*. Uma árvore *Neighbor-joining* foi construída com estas sequências e as sequências das espécies mais próximas (Figura 8).

Tabela 3 - Resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA para a identificação das 40 linhagens selecionadas (continua)

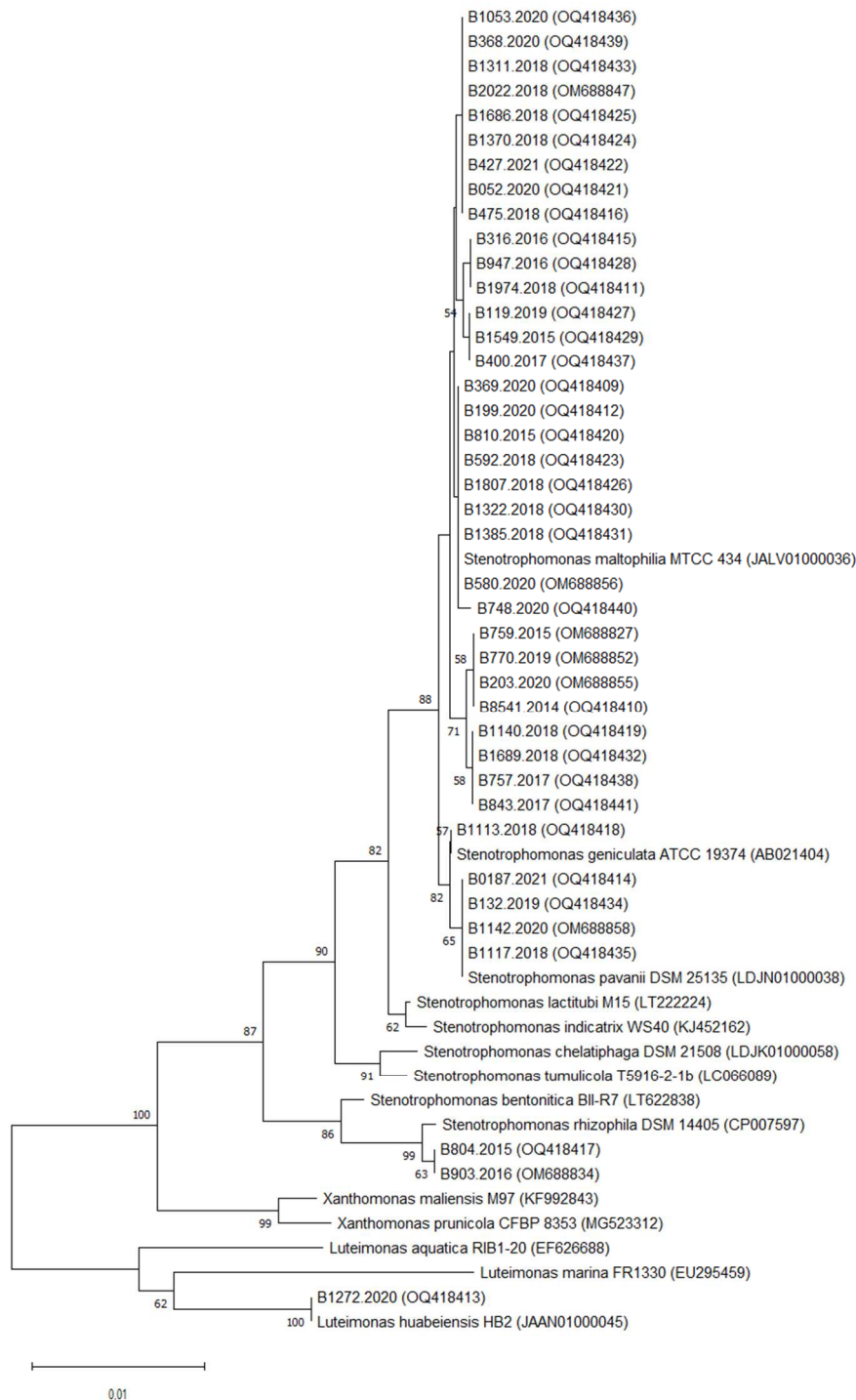
Linhagem	N° acesso	Pares de base	Resultado da análise do gene 16S rRNA
B369.2020	OQ418409	1.489	<i>S. maltophilia</i> (99,66)/ <i>S. geniculata</i> (99,37)/ <i>S. pavanni</i> (99,31)/ <i>S. lactitubi</i> (98,90)/ <i>S. indicatrix</i> (98,70)
B8541.2014	OQ418410	1.501	<i>S. geniculata</i> (99,30)/ <i>S. indicatrix</i> (99,11)/ <i>S. pavanni</i> (99,05%)/ <i>S. lactitubi</i> (99,05)/ <i>S. maltophilia</i> (98,98)
B1974.2018	OQ418411	1.475	<i>S. geniculata</i> (99,30)/ <i>S. indicatrix</i> (99,11)/ <i>S. pavanni</i> (99,05)/ <i>S. lactitubi</i> (99,05)/ <i>S. maltophilia</i> (98,98)
B199.2020	OQ418412	1.507	<i>S. geniculata</i> (99,86)/ <i>S. maltophilia</i> (99,66)/ <i>S. pavanni</i> (99,59)/ <i>S. indicatrix</i> (99,18)/ <i>S. lactitubi</i> (99,11)
B1272.2020	OQ418413	1.486	<i>Luteimonas huabeiensis</i> (99,79)
B0187.2021	OQ418414	1.487	<i>S. pavanni</i> (99,73)/ <i>S. geniculata</i> (99,65)/ <i>S. maltophilia</i> (99,38)/ <i>S. indicatrix</i> (99,70)
B316.2016	OQ418415	1.501	<i>S. geniculata</i> (99,65)/ <i>S. maltophilia</i> (99,59)/ <i>S. pavanni</i> (99,59)/ <i>S. lactitubi</i> (99,25)/ <i>S. indicatrix</i> (99,18)
B475.2018	OQ418416	1.476	<i>S. geniculata</i> (99,58)/ <i>S. maltophilia</i> (99,32)/ <i>S. indicatrix</i> (99,18)/ <i>S. lactitubi</i> (99,11)/ <i>S. pavanni</i> (98,98)
B804.2015	OQ418417	1.502	<i>S. rhizophila</i> (99,73)/ <i>S. bentonitica</i> (99,06)/ <i>S. tumulicola</i> (98,71)
B1113.2018	OQ418418	1.486	<i>S. geniculata</i> (99,86)/ <i>S. pavanii</i> (99,18)/ <i>S. maltophilia</i> (98,97)/ <i>S. indicatrix</i> (98,84)
B1140.2018	OQ418419	1.501	<i>S. maltophilia</i> (99,45)/ <i>S. pavanii</i> (99,38)/ <i>S. geniculata</i> (99,36)/ <i>S. lactitubi</i> (99,11)/ <i>S. indicatrix</i> (98,91)
B810.2015	OQ418420	1.416	<i>S. maltophilia</i> (99,72)/ <i>S. geniculata</i> (99,28)/ <i>S. pavanii</i> (99,43)/ <i>S. lactitubi</i> (99,22)/ <i>S. indicatrix</i> (99,00)
B052.2020	OQ418421	1.487	<i>S. geniculata</i> (99,72)/ <i>S. maltophilia</i> (99,38)/ <i>S. pavanii</i> (99,22)/ <i>S. lactitubi</i> (99,15)/ <i>S. indicatrix</i> (98,79)
B203.2020	OM688855	1.469	<i>S. lactitubi</i> (99,32)/ <i>S. maltophilia</i> (99,25)/ <i>S. indicatrix</i> (99,11)/ <i>S. pavanii</i> (99,04)/ <i>S. geniculata</i> (99,01)
B427.2021	OQ418422	1.498	<i>S. geniculata</i> (99,72)/ <i>S. maltophilia</i> (99,52)/ <i>S. pavanii</i> (99,45)/ <i>S. lactitubi</i> (99,18)/ <i>S. indicatrix</i> (99,11)
B759.2015	OM688827	1.500	<i>S. pavanii</i> (99,32)/ <i>S. maltophilia</i> (99,25)/ <i>S. lactitubi</i> (99,05)/ <i>S. geniculata</i> (99,01)/ <i>S. indicatrix</i> (98,84)
B592.2018	OQ418423	1.485	<i>S. maltophilia</i> (99,73)/ <i>S. geniculata</i> (99,37)/ <i>S. pavanii</i> (99,25)/ <i>S. lactitubi</i> (98,97)
B1370.2018	OQ418424	1.486	<i>S. geniculata</i> (99,72)/ <i>S. maltophilia</i> (99,45)/ <i>S. pavanii</i> (99,38)/ <i>S. lactitubi</i> (99,11)/ <i>S. indicatrix</i> (99,04)
B1686.2018	OQ418425	1.486	<i>S. geniculata</i> (99,72)/ <i>S. maltophilia</i> (99,11)/ <i>S. pavanii</i> (99,11)/ <i>S. indicatrix</i> (99,04)/ <i>S. lactitubi</i> (98,97)
B1807.2018	OQ418426	1.501	<i>S. maltophilia</i> (100,0)/ <i>S. pavanii</i> (99,59)/ <i>S. geniculata</i> (99,37)/ <i>S. lactitubi</i> (99,32)/ <i>S. indicatrix</i> (99,98)

Tabela 3 - Resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA para a identificação das 40 linhagens selecionadas (conclusão)

B119.2019	OQ418427	1.506	<i>S. geniculata</i> (99.79)/ <i>S. maltophilia</i> (99.45)/ <i>S. pavanii</i> (99.45)/ <i>S. indicatrix</i> (99.11)/ <i>S. lactitubi</i> (99.04)
B947.2016	OQ418428	1.500	<i>S. maltophilia</i> (99.59)/ <i>S. pavanii</i> (99.59)/ <i>S. geniculata</i> (99.37)/ <i>S. lactitubi</i> (99.11)/ <i>S. indicatrix</i> (98.91)
B1549.2015	OQ418429	1.502	<i>S. maltophilia</i> (99.73)/ <i>S. pavanii</i> (99.73)/ <i>S. geniculata</i> (99.51)/ <i>S. lactitubi</i> (98.98)/ <i>S. indicatrix</i> (98.77)
B1322.2018	OQ418430	1.502	<i>S. maltophilia</i> (99.80)/ <i>S. pavanii</i> (99.73)/ <i>S. geniculata</i> (99.58)/ <i>S. lactitubi</i> (99.04)/ <i>S. indicatrix</i> (98.84)
B1385.2018	OQ418431	1.410	<i>S. maltophilia</i> (99.72)/ <i>S. geniculata</i> (99.71)/ <i>S. pavanii</i> (99.64)/ <i>S. lactitubi</i> (99.08)/ <i>S. indicatrix</i> (98.93)
B1689.2018	OQ418432	1.498	<i>S. maltophilia</i> (99.45)/ <i>S. pavanii</i> (99.38)/ <i>S. geniculata</i> (99.36)/ <i>S. lactitubi</i> (99.11)/ <i>S. indicatrix</i> (98.90)
B770.2019	OM688852	1.456	<i>S. pavanii</i> (99.09)/ <i>S. maltophilia</i> (99.02)/ <i>S. geniculata</i> (98.93)/ <i>S. lactitubi</i> (98.81)
B2022.2018	OM688847	1.500	<i>S. geniculata</i> (99.65)/ <i>S. pavanii</i> (99.39)/ <i>S. maltophilia</i> (99.32)/ <i>S. indicatrix</i> (99.32)/ <i>S. lactitubi</i> (99.25)
B1311.2018	OQ418433	1.406	<i>S. geniculata</i> (99.71)/ <i>S. pavanii</i> (99.64)/ <i>S. maltophilia</i> (99.57)/ <i>S. indicatrix</i> (99.22))/ <i>S. lactitubi</i> (99.15)
B132.2019	OQ418434	1.487	<i>S. pavanii</i> (99.66)/ <i>S. geniculata</i> (99.65)/ <i>S. maltophilia</i> (99.31)
B1142.2020	OM688858	1.501	<i>S. pavanii</i> (99.73)/ <i>S. geniculata</i> (99.65)/ <i>S. maltophilia</i> (99.38)/ <i>S. indicatrix</i> (98.70)
B1117.2018	OQ418435	1.496	<i>S. pavanii</i> (99.73)/ <i>S. geniculata</i> (99.65)/ <i>S. maltophilia</i> (99.38)/ <i>S. indicatrix</i> (98.70)
B1053.2020	OQ418436	1.498	<i>S. geniculata</i> (99.65)/ <i>S. pavanii</i> (99.18)/ <i>S. maltophilia</i> (99.11)/ <i>S. indicatrix</i> (99.11)/ <i>S. lactitubi</i> (99.04)
B903.2016	OM688834	1.479	<i>S. rhizophila</i> (99.79)/ <i>S. bentonitica</i> (99.13)
B400.2017	OQ418437	1.501	<i>S. maltophilia</i> (99.86)/ <i>S. pavanii</i> (99.59)/ <i>S. geniculata</i> (99.37)/ <i>S. lactitubi</i> (99.11)/ <i>S. indicatrix</i> (98.91)
B757.2017	OQ418438	1.505	<i>S. maltophilia</i> (99.45)/ <i>S. pavanii</i> (99.39)/ <i>S. geniculata</i> (99.08)/ <i>S. lactitubi</i> (98.98)
B368.2020	OQ418439	1.502	<i>S. geniculata</i> (99.58)/ <i>S. maltophilia</i> (99.39)/ <i>S. pavanii</i> (99.32)/ <i>S. lactitubi</i> (99.18)/ <i>S. indicatrix</i> (99.98)
B580.2020	OM688856	1.411	<i>S. geniculata</i> (99.86)/ <i>S. maltophilia</i> (99.79)/ <i>S. pavanii</i> (99.71)/ <i>S. lactitubi</i> (99.14)/ <i>S. indicatrix</i> (99.07)
B748.2020	OQ418440	1.502	<i>S. maltophilia</i> (99.86)/ <i>S. pavanii</i> (99.52)/ <i>S. geniculata</i> (99.37)/ <i>S. lactitubi</i> (99.11)/ <i>S. indicatrix</i> (98.91)
B843.2017	OQ418441	1.473	<i>S. maltophilia</i> (99.45)/ <i>S. pavanii</i> (99.38)/ <i>S. geniculata</i> (99.36)/ <i>S. lactitubi</i> (99.10)/ <i>S. indicatrix</i> (99.89)

Fonte: A autora (2023).

Figura 8 - *Neighbor-joining* com base em seqüências quase completas do gene 16S rRNA (1.314 pb) mostrando a posição filogenética das linhagens avaliadas neste estudo (n=40) com espécies estreitamente relacionadas



Legenda: Os números dos ramos indicam a porcentagem de 1.000 réplicas de bootstrap; apenas valores >50% são mostrados. A barra de escala representa 0,01 substituições por posição de nucleotídeo. O número de acesso ao GenBank é discriminado entre parênteses.

Fonte: A autora (2023).

Os iniciadores SM1 e SM4 utilizados para a amplificação do gene 23S rDNA e identificação de *S. maltophilia* por PCR espécie-específico, amplificaram o fragmento com aproximadamente 531 pb de 39 linhagens das 40 selecionadas neste estudo, com exceção da B1272.2020 (identificada como *Luteimonas huabeiensis* pela análise do gene 16S rDNA). Das linhagens de referência da ATCC testadas, somente a *S. maltophilia* ATCC 13637 apresentou banda referente à amplificação do produto com 531 pb.

Com o objetivo de uma identificação mais fidedigna, as linhagens B804.2015 e B903.2016, que não apresentaram como possibilidade de resultado *S. maltophilia* na análise do gene 16S rDNA, tiveram o produto obtido na PCR espécie-específico sequenciado. O fragmento obtido foi comparado com outras sequências depositadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) por meio do uso da BLAST e foi identificado como pertencente à espécie *S. rhizophila* (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre a identificação por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA e do gene 23S rDNA

Linhagem	Identificação por análise do gene 16S rDNA			Identificação por análise do gene 23S rDNA		
	N.º acesso	Tamanho (bp)	Resultado ^a	N.º acesso	Tamanho (bp)	Resultado ^b
B804.2015	OQ418417	1.502	<i>S. rhizophila</i> (99,73%) / <i>S. bentonitica</i> (99,06%) <i>S. tumulicola</i> (98,71%)	OQ442331	535	<i>S. rhizophila</i> (99,62%)
B903.2016	OM688834	1.449	<i>S. rhizophila</i> (99,79%) / <i>S. bentonitica</i> (99,13%)	OQ442343	532	

^a Os resultados foram obtidos no website: <https://www.ezbiocloud.net/> (YOON et al, 2017, Database Update: 07/07/2021, último acesso: 20/02/2023); ^b Resultados obtidos no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) utilizando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).
Fonte: A autora (2023).

4.2.2 Tipificação

As 37 linhagens identificadas como *S. maltophilia* foram selecionadas para a caracterização molecular pela técnica do MLST (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados obtidos após o sequenciamento dos genes *housekeepings* utilizados para a tipificação das linhagens de *S. maltophilia* pela técnica *Multi-locus sequence typing*

Linhagem	Gene							
	<i>atpD</i>	<i>gapA</i>	<i>guaA</i>	<i>mutM</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>	<i>ST</i>
B369.2020	1	4	336	3	25	38	1	408
B8541.2014	118	142	211	104	ND ¹	157	129	ND
B1974.2018	2	122	556	269	ND	292	128	ND
B199.2020	80	88	355	ND	ND	97	254	ND
B0187.2021	94	20	170	25	14	17	3	233
B316.2016	2	122	556	269	ND	292	128	ND
B475.2018	76	227	418	ND	80	186	220	ND
B1113.2018	16	9	32	ND	20	9	18	ND
B1140.2018	30	10	10	14	23	23	26	34
B810.2015	83	4	1	3	ND	83	7	ND
B052.2020	16	212	557	213	69	240	64	915
B203.2020	23	15	35	30	17	27	25	41
B427.2021	16	212	367	213	69	240	64	916
B759.2015	16	263	554	268	208	291	255	917
B592.2018	3	1	558	3	25	4	62	918
B1370.2018	16	212	557	ND	69	240	64	ND
B1686.2018	127	225	559	ND	209	293	256	ND
B1807.2018	3	1	84	57	25	82	6	115
B119.2019	6	18	99	ND	76	89	6	ND
B947.2016	93	100	93	ND	63	9	94	ND
B1549.2015	71	74	90	56	2	3	5	94
B1322.2018	93	122	180	45	63	69	5	239
B1385.2018	21	26	98	ND	75	2	15	ND
B1689.2018	30	10	10	14	23	23	15	919
B770.2019	201	261	553	266	210	290	252	922
B2022.2018	197	226	536	148	139	186	248	867
B1311.2018	197	226	536	ND	139	186	248	ND
B132.2019	94	20	170	ND	14	17	3	ND
B1142.2020	94	20	170	25	14	17	3	233
B1117.2018	94	20	170	25	14	17	3	233
B1053.2020	197	226	536	148	139	186	248	867
B400.2017	19	5	8	ND	5	26	6	ND
B757.2017	202	262	555	267	207	23	253	920
B368.2020	43	13	52	ND	45	40	17	ND
B580.2020	6	18	11	ND	76	2	2	ND
B748.2020	4	22	159	5	70	6	9	212
B843.2017	30	10	176	14	23	23	26	921

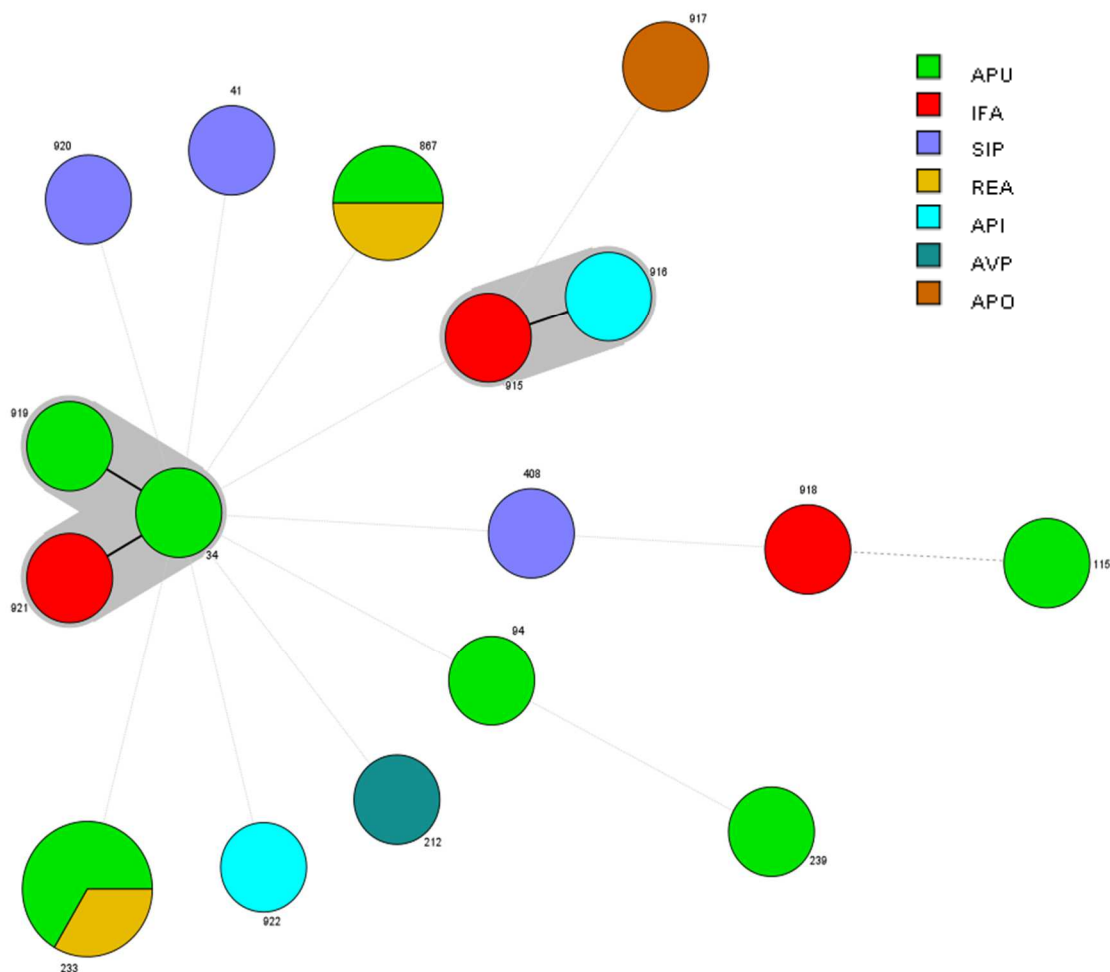
Legenda: Os ST novos foram apresentados em negrito; ND = não determinado.

Fonte: A autora (2023).

Foram obtidos 17 ST distintos: ST 34, ST 41, ST 94, ST 115, ST 212, ST 233, ST 239, ST 408, ST 867, ST 915, ST 916, ST 917, ST 918, ST 919, ST 920, ST 921 e ST 922, uma proporção de 1,18 Perfil/linhagem, sendo que oito deles (ST 915, ST 916, ST 917, ST 918, ST 919, ST 920, ST 921 e ST 922) foram descritos neste estudo e depositados no banco de dados PubMLST. Vinte e nove alelos novos foram descritos, dois do gene *atpD* (201 e 202), três do gene *gapA* (261, 262 e 263), sete do gene *guaA* (553, 554, 555, 556, 557, 558 e 559), quatro do gene *mutM* (266, 267, 268 e 269), quatro do gene *nuoD* (207, 208, 209 e 210), quatro do gene *ppsA* (290, 291, 292 e 293) e cinco do gene *recA* (252, 253, 254, 255 e 256) (Tabela 5). Não foi possível a determinação do ST de 17 linhagens devido à dificuldade de sequenciar os alelos do gene *mutM* ou *nuoD*.

As relações genéticas entre os ST identificados estão apresentados na figura 9. O índice de Simpson calculado foi de 0,979, com LIC = 0,958 e LSC = 1,000.

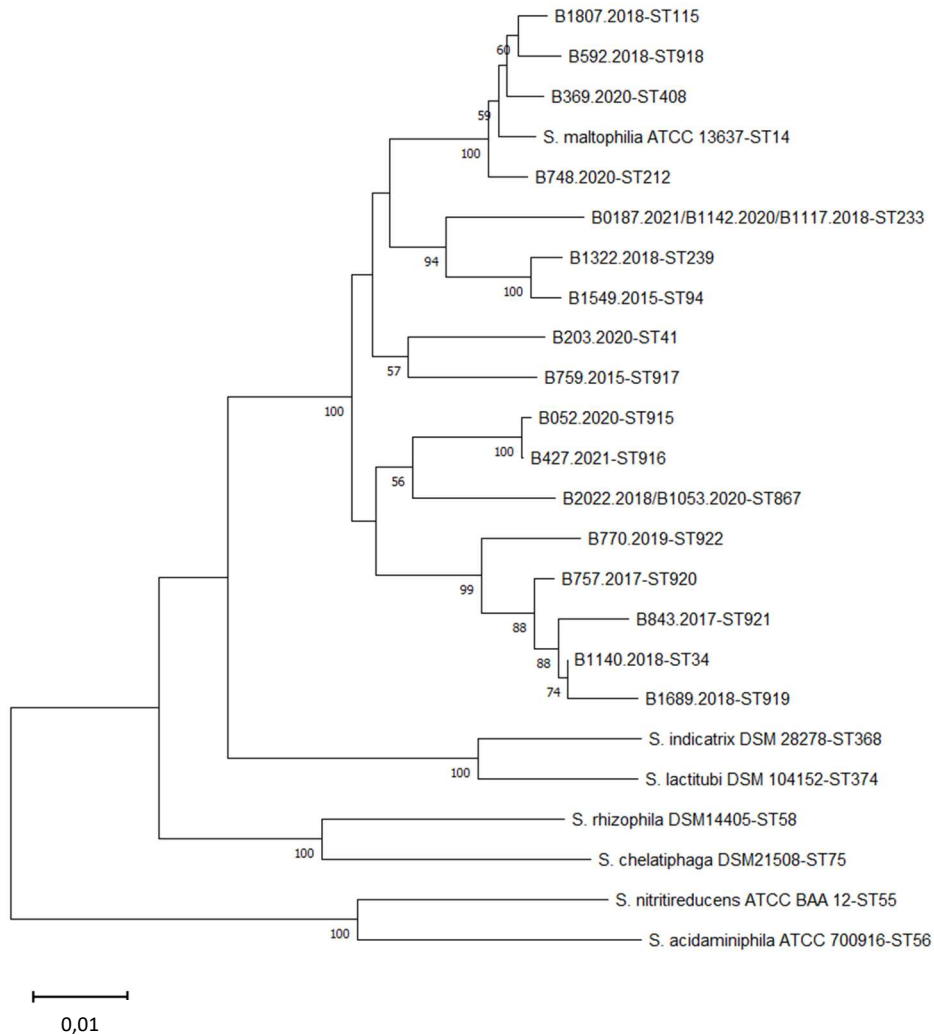
Figura 9 - *Minimum spanning tree* entre os ST de *S. maltophilia* e a origem de isolamento



Legenda: Relação genética entre os complexos clonais (CC) das linhagens de *S. maltophilia* isoladas neste estudo. A árvore foi construída por meio do *software BioNumerics 8.1* (Applied Maths, bioMérieux) de acordo com os ST identificados pelo MLST. Linhas que ligam os ST, indicam que eles diferem em um alelo (linha grossa sólida), ou três a cinco locus (linhas finas e pontilhadas). As linhagens foram distribuídas a partir da fonte de isolamento. Água purificada (APU); água potável (APO); água para injetáveis (API); reagentes (REA); amostra de validação de processo (AVP); solução intermediária de processo (SIP) e insumo farmacêutico ativo (IFA).

Fonte: A autora (2023).

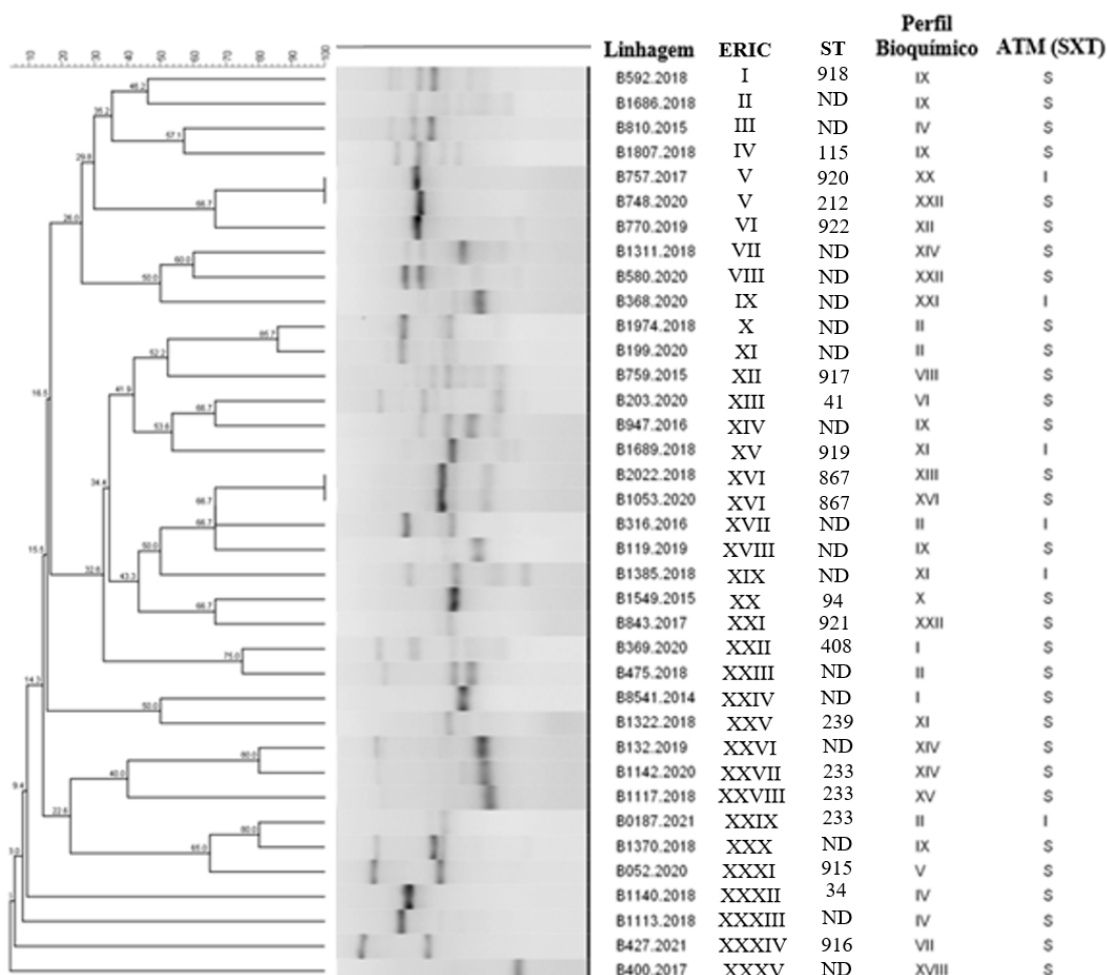
Figura 10 - Árvore filogenética “*maximum likelihood*” baseada nas sequências dos sete genes do MLST concatenados (3951 pb) das 20 linhagens de *S. maltophilia* e espécies relacionadas depositadas no banco de dados PubMLST



Fonte: A autora (2023).

A variabilidade genética dos 37 isolados de *S. maltophilia* também foi avaliada por ERIC-PCR. A partir dessa técnica, foram obtidos 35 perfis de bandas distintos, uma proporção de 1,06 linhagem/perfil, indicando uma grande diversidade genética entre as linhagens analisadas (Figura 11). O número de bandas identificado nas linhagens variou de 1 a 7, com média e mediana igual a 3. O índice de Simpson calculado foi de 0,997, com LIC = 0,991 e LSC = 1,003.

Figura 11 - Perfil de bandas representativo de 37 linhagens de *S. maltophilia* selecionadas para este estudo por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction*



Legenda: Antimicrobiano (ATM); Sulfametoxazol-trimetoprim (SXT); Tipo sequencial (ST); Não determinado (ND).

Fonte: A autora (2023).

4.4 Avaliação do biofilme, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e capacidade agregativa

Os resultados da avaliação do biofilme estão apresentados na Tabela 6. Das 37 linhagens, 36 (97,3%) apresentaram biofilme classificado como FMA ou MA e uma (2,7%) como FA, em ambas as temperaturas estudadas. As linhagens classificadas como MA ou FMA, foram selecionadas para a avaliação da tolerância do biofilme frente a desinfetantes.

Tabela 6 - Classificação e tolerância do biofilme frente a desinfetantes das linhagens de *S. maltophilia*

Linhagem	Produção de biofilme	Álcool etílico 70 %	Hipoclorito (%)		Quaternário de amônio (%)	
			0,5	0,1	0,05	0,08
B369.2020	3	3	0	2	2	3
B8541.2014	3	3	2	3	3	3
B1974.2018	3	3	1	1	3	3
B199.2020	3	3	1	1	2	3
B0187.2021	3	3	0	1	2	3
B316.2016	3	3	1	1	3	2
B475.2018	3	3	1	2	3	3
B1113.2018	3	3	1	3	3	3
B1140.2018	3	3	1	2	3	3
B810.2015	3	3	1	2	3	3
B052.2020	3	3	1	2	3	3
B203.2020	1	NR	NR	NR	NR	NR
B427.2021	3	3	0	2	2	3
B759.2015	3	3	1	2	3	3
B592.2018	3	3	1	1	3	3
B1370.2018	3	3	0	2	3	3
B1686.2018	3	2	0	1	2	3
B1807.2018	2	3	0	2	2	2
B119.2019	3	3	1	2	3	3
B947.2016	3	3	1	2	3	3
B1549.2015	3	3	0	3	2	3
B1322.2018	3	3	1	3	3	3
B1385.2018	3	3	1	1	3	2
B1689.2018	3	3	2	3	3	2
B770.2019	3	3	0	3	3	2
B2022.2018	3	3	0	2	2	2
B1311.2018	3	3	1	2	3	2
B132.2019	3	3	1	1	2	3
B1142.2020	3	3	0	1	2	2
B1117.2018	3	3	0	0	2	3
B1053.2020	3	3	0	1	1	2
B400.2017	3	3	0	1	3	3
B757.2017	3	3	1	2	3	3
B368.2020	3	3	0	1	1	1
B580.2020	2	2	0	0	2	1
B748.2020	3	3	0	2	2	3
B843.2017	3	3	0	2	3	3

Legenda: não aderente (0), fracamente aderente (1), moderadamente aderente (2), fortemente aderente (3); (NR) não realizado.

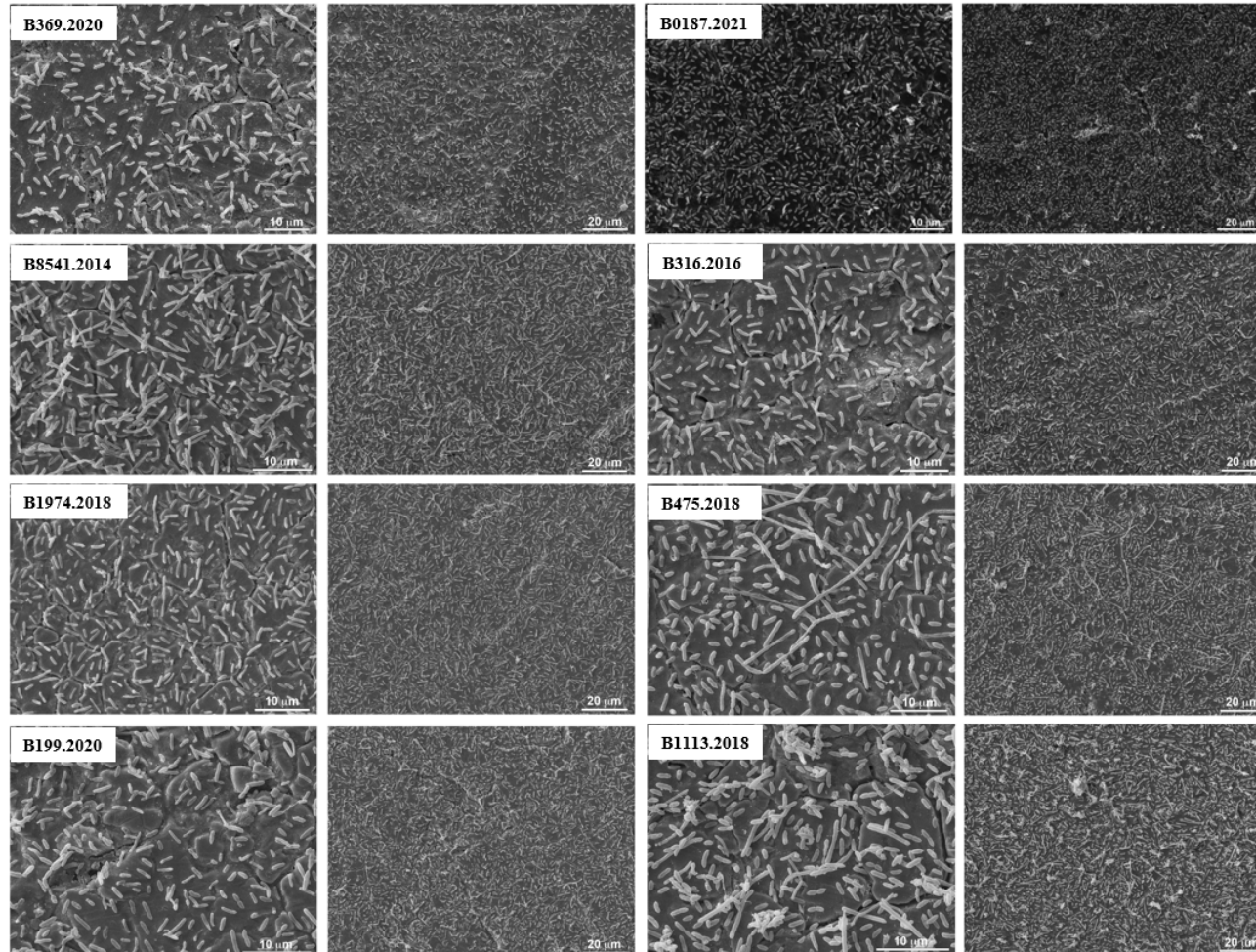
Fonte: A autora (2023).

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, no teste de disco difusão todas as linhagens de *S. maltophilia* apresentaram sensibilidade a MIN e LVX. Seis (16,2%) linhagens (B187.2021, B316.2016, B1385.2018, B1689.2018, B757.2017 e B368.2020) apresentaram resistência intermediária a SXT. As linhagens que apresentaram resistência intermediária ao SXT foram selecionadas para a determinação da concentração inibitória mínima através do E-test e foram classificadas como sensíveis.

Quanto a avaliação da capacidade agregativa, todas as linhagens avaliadas apresentaram sedimento < 0,1 mL em ambas as condições (estática e sob agitação) sendo classificadas como não agregativas.

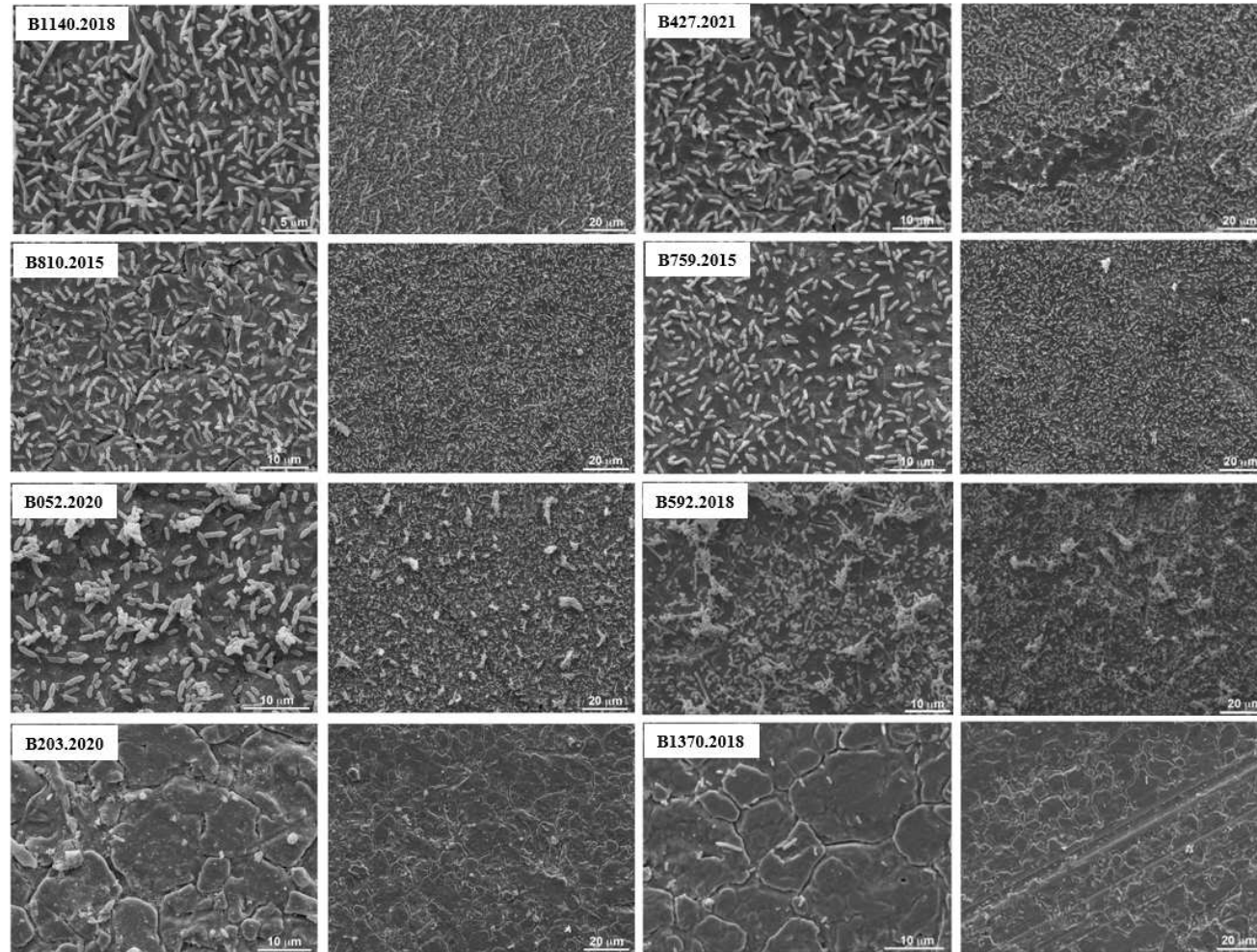
O biofilme das linhagens identificadas como *S. maltophilia* também foi avaliado pela técnica de MEV em superfície de aço inox (Figura 12, 13, 14, 15 e 16). Os resultados obtidos corroboraram com a classificação do biofilme formado em placas de poliestireno e foi caracterizado por uma distribuição homogênea de bactérias na superfície com a formação de poucos agregados para a maioria das linhagens analisadas, com exceção da linhagem B203.2020.

Figura 12 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B369.2020, B8541.2014, B1974.2018, B199.2020, B0187.2021, B316.2016, B475.2018 e B1113.2018 por meio de microscopia eletrônica de varredura



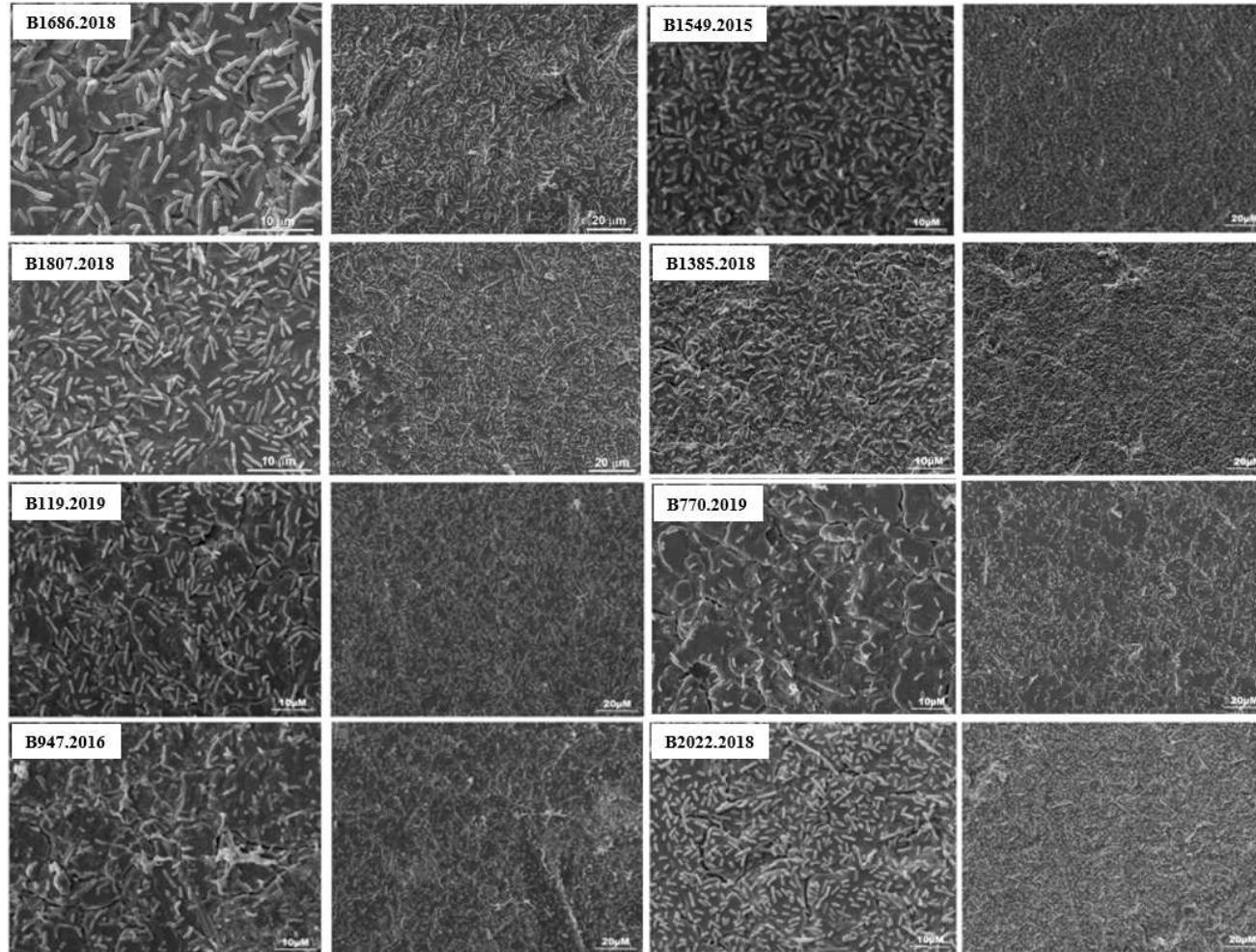
Legenda: Na direita observamos a dimensão de 20 µm e na esquerda, a dimensão de 10 µm.

Figura 13 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B1140.2018, B810.2015, B052.2020, B203.2020, B427.2021, B759.2015, B592.2018 e B1370.2018 por meio de microscopia eletrônica de varredura



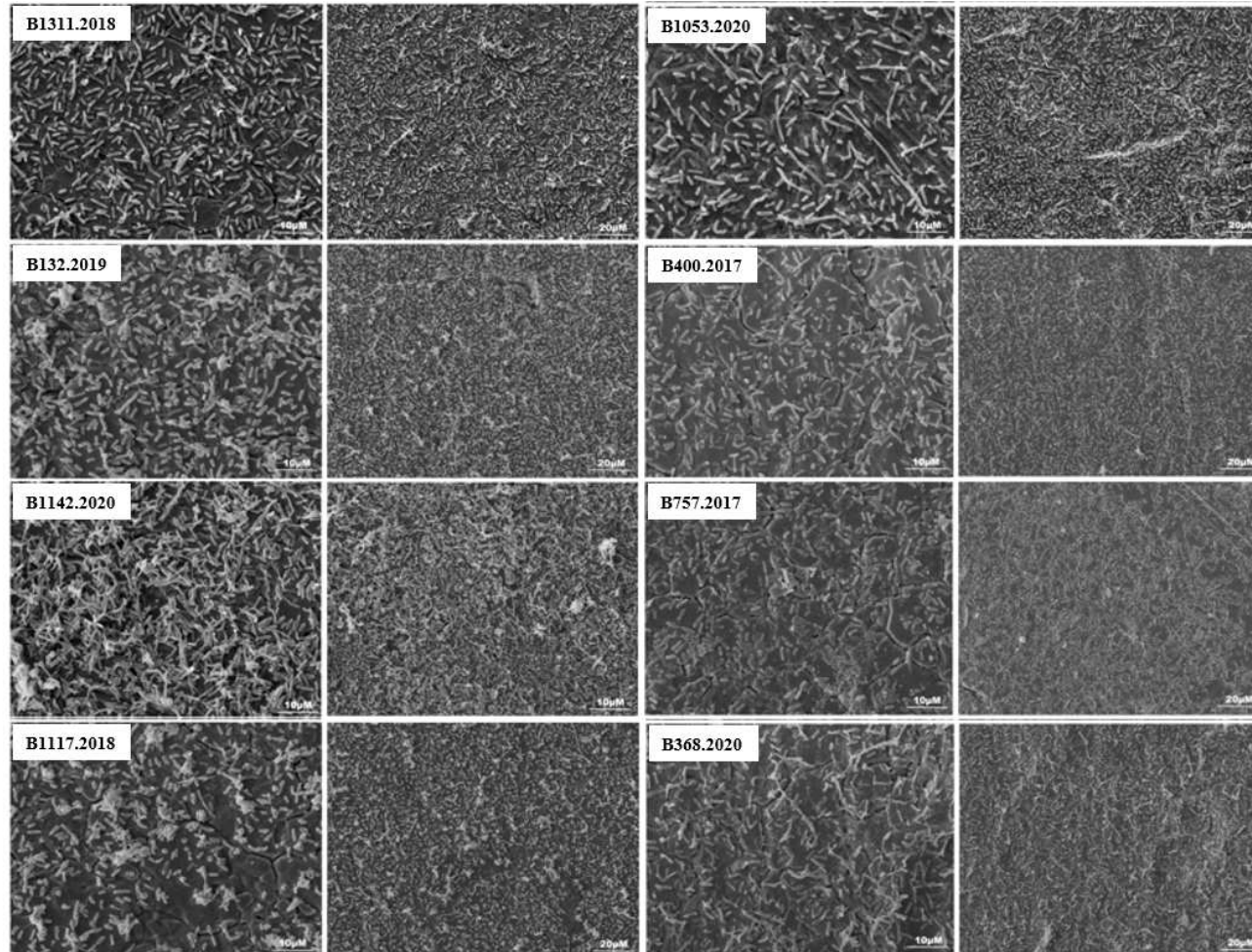
Legenda: Na direita observamos a dimensão de 20 µm e na esquerda, a dimensão de 10 µm.

Figura 14 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B1686.2018, B1807.2018, B119.2019, B947.2016, B1549.2015, B1385.2018, B770.2019 e B2022.2018 por meio de microscopia eletrônica de varredura



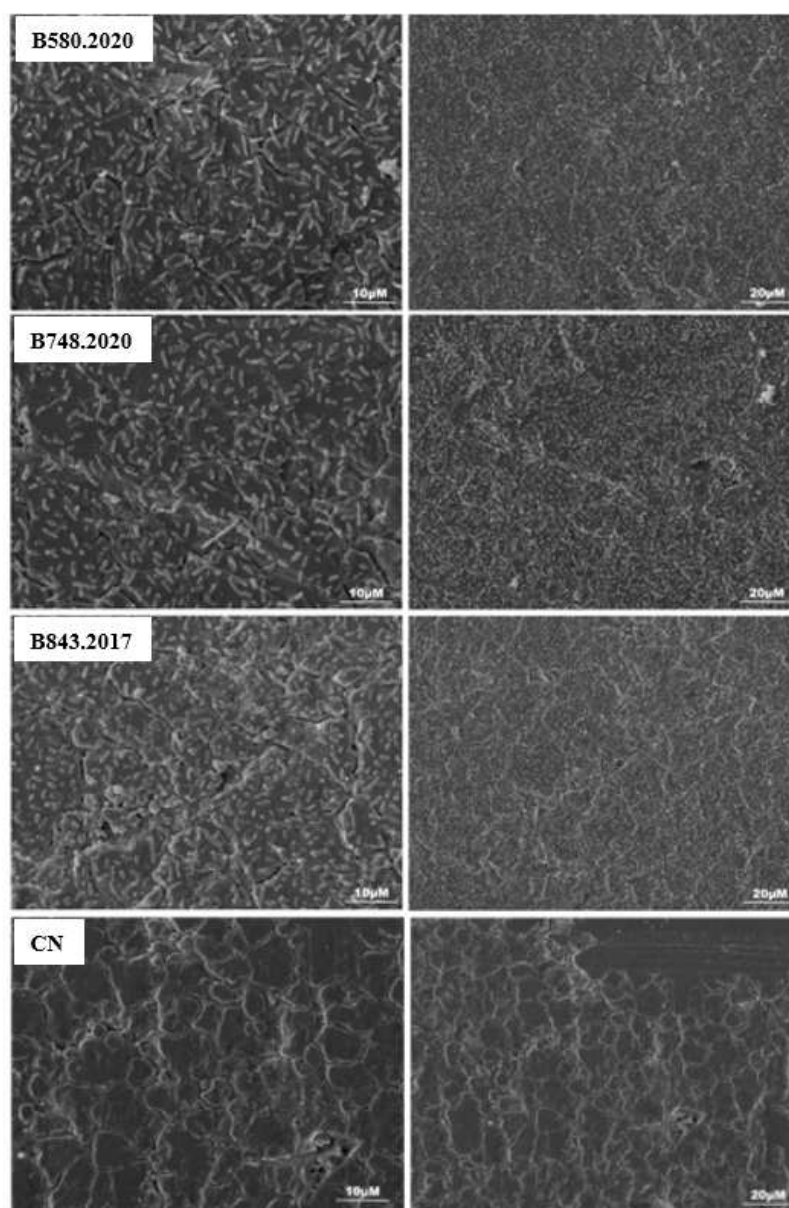
Legenda: Na direita observamos a dimensão de 20 μm e na esquerda, a dimensão de 10 μm.

Figura 15 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B1311.2018, B132.2019, B1142.2020, B1117.2018, B1053.2020, B400.2017, B757.2017 e B368.2020 por meio de microscopia eletrônica de varredura



Legenda: Na direita observamos a dimensão de 20 µm e na esquerda, a dimensão de 10 µm.

Figura 16 - Análise morfológica da formação de biofilme das linhagens B580.2020, B748.2020 e B843.2017 por meio de microscopia eletrônica de varredura



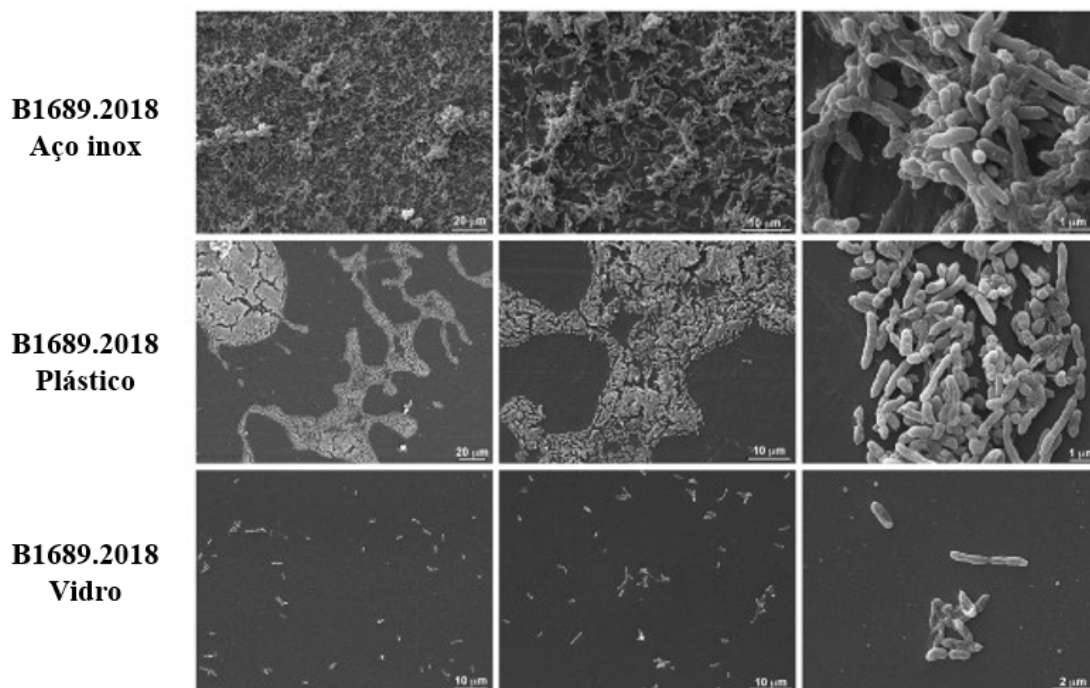
Legenda: Controle negativo (CN). Na direita observamos a dimensão de 20 μm e na esquerda, a dimensão de 10 μm .

Fonte: A autora (2023).

A linhagem B1689.2018 foi selecionada para avaliação da formação de biofilme em três diferentes tipos de superfícies que podem ser encontradas na indústria farmacêutica, aço inox, poliestireno de baixa densidade e vidro. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17. O vidro foi a superfície que apresentou a menor quantidade de microrganismos agregados. Na superfície de poliestireno de baixa

densidade, foi observada uma distribuição homogênea e no aço inox destaca-se a presença de muitos agregados.

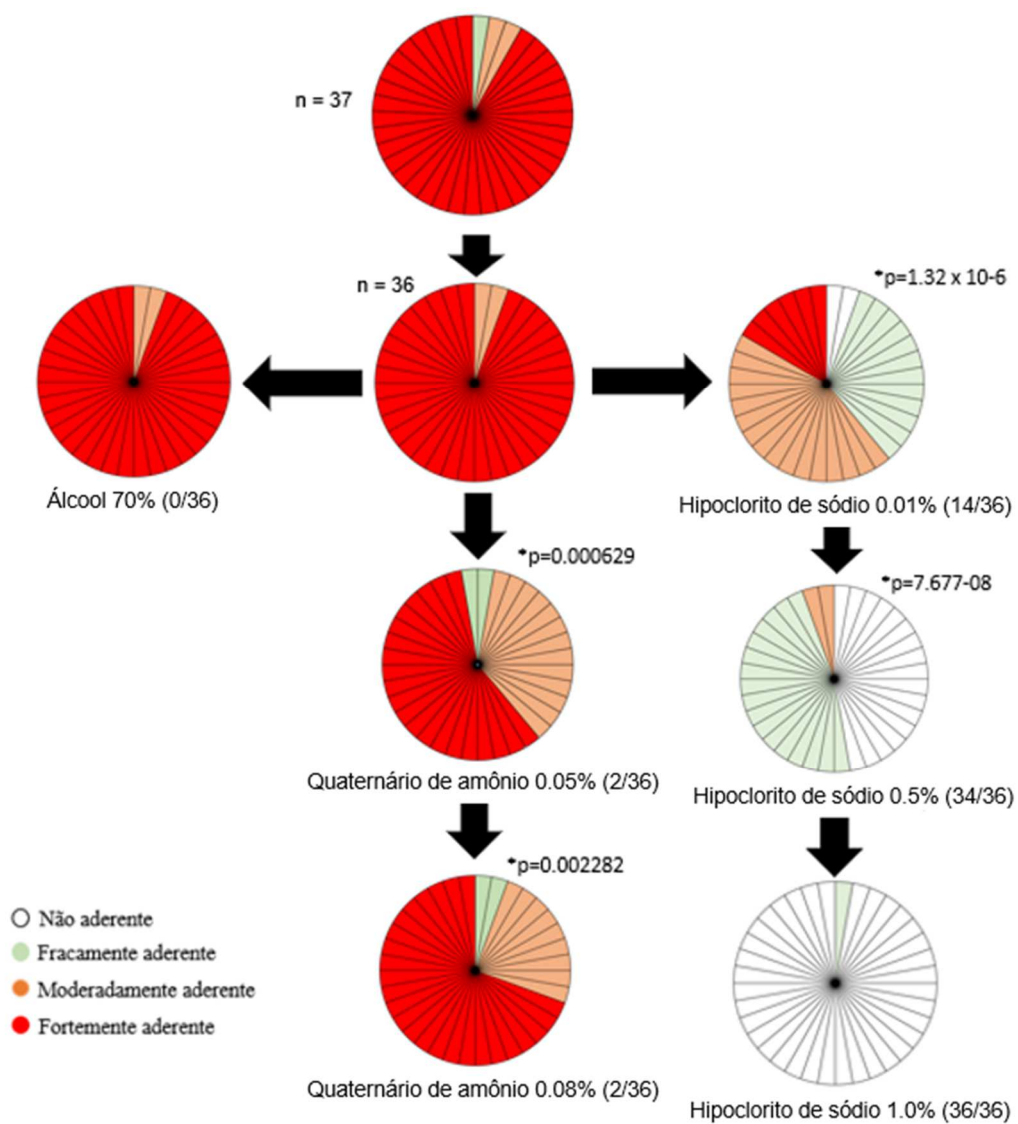
Figura 17 - Análise morfológica da formação de biofilme da linhagem B1689.2028 em superfícies de aço inox, poliestireno de baixa densidade e vidro por meio de microscopia eletrônica de varredura



Fonte: A autora (2023).

A exposição ao álcool etílico 70% não foi capaz de reduzir o biofilme formado por nenhuma linhagem ($p=1,000$). O quaternário de amônio na concentração de 0,05 % reduziu o biofilme de 15 linhagens (41,60 %; $p = 0,000629$), enquanto na concentração de 0,08% foi capaz de reduzir o biofilme de 11 linhagens (30,50%; $p = 0,002282$). O hipoclorito de sódio nas concentrações 0,1 % e 0,5 %, foi capaz de reduzir o biofilme de 77,70% ($p = 1,329 \times 10^{-6}$) e 94,40% ($p = 7,677 \times 10^{-8}$) das linhagens, respectivamente. Nas concentrações ≥ 1 %, o hipoclorito de sódio foi capaz de reduzir 100,00% do biofilme produzido (Figura 18).

Figura 18 - Frequência da classificação do biofilme após o tratamento com os desinfetantes



Fonte: A autora (2023).

5 DISCUSSÃO

A diversidade de *S. maltophilia* e a sua resistência intrínseca a múltiplos agentes antimicrobianos já é bem conhecida em ambientes hospitalares (Pompilio et al., 2011; Bostanghadiri, 2019). Contudo, existem poucos estudos que discutam técnicas de identificação e tipagem e o perfil de resistência desta espécie quando isoladas de ambientes da indústria farmacêutica, que é o caso do presente estudo.

Os resultados da análise de similaridade dos perfis bioquímicos obtidos a partir dos 47 testes bioquímicos do VITEK[®]2 demonstraram uma grande diversidade de fenótipos, apresentando LX perfis diferentes (Tabela 1) e um índice de Simpson de 0,909 [0,887-0,931]. Segundo Hunter e Gaston (1988), um nível aceitável de discriminação é > 0,90. A avaliação do perfil fenotípico pode ser considerada uma ferramenta interessante para uma investigação rápida e inicial numa indústria farmacêutica podendo ser utilizada para revelar possíveis fontes comuns de contaminação na cadeia produtiva (Vasconcellos et al., 2021a). Apesar disso, a baixa especificidade do VITEK[®]2 pode gerar resultados incorretos, sendo indicado o uso de outras metodologias para uma melhor identificação e resolução da origem clonal dessas estirpes. Neste estudo, o VITEK[®]2 identificou incorretamente três linhagens como *S. maltophilia*, resultados semelhantes ao encontrados por Pinot et al. (2011), os quais relataram que linhagens do gênero *Pseudomonas* e de *S. rhizophila* foram incorretamente identificadas como *S. maltophilia* por meio desse sistema. Isso porque não existem outras espécies do gênero *Stenotrophomonas*, além da espécie *S. maltophilia*, na base de dados do VITEK 2.

Das 40 linhagens selecionadas para a caracterização polifásica, o MALDI-TOF MS foi capaz de identificar 37 como *S. maltophilia* demonstrando uma maior especificidade (em paralelo ao resultado obtido pela análise do 16S rDNA e 23S rDNA), quando comparada com VITEK[®]2. Embora o MALDI-TOF MS seja uma técnica de baixo custo e de fácil execução, a mesma ainda possui a sua base de dados centrada na identificação de microrganismos de maior interesse na área clínica (Moreira et al., 2021; Costa et al., 2022a,b). As linhagens B804.2015, B903.2016 e B1272.2020, que não foram identificadas pelo MALDI-TOF MS, foram posteriormente identificadas como *S. rhizophila* e *L. huabeiensis* por meio de métodos genotípicos (Tabela 3 e 4). Ambas as espécies são de origem ambiental, tendo *L. huabeiensis* já sido isolada de água extraída

de solo (Wu et al., 2013) e *S. rhizophila* é mais comumente encontrada em raízes de plantas (McEWAN et al., 2017; PINSKI et al., 2020). No presente estudo, *L. huabeiensis* foi identificada numa amostra de API e *S. rhizophila* foi identificada a partir de uma amostra de APU e durante um processo de validação (Tabela 2). Essas espécies não estão incluídas na base de dados do VITEK[®] MS RUO. Entretanto, o software permite a inserção de novos espectros para criação de um banco de dados personalizado após a identificação da espécie por meio de outras metodologias, principalmente as baseadas em sequenciamento genético (Costa et al., 2022b).

O sequenciamento do gene 16S rRNA apresentou uma baixa resolução para a identificação de *S. maltophilia*, sendo capaz de realizar uma identificação apenas em nível de gênero, ou seja, apresentou mais de uma espécie dentro do gênero *Stenotrophomonas* como possibilidade (Tabela 3). Church et al. (2020) já haviam relatado as limitações desse método para a identificação de espécies, principalmente as que são muito relacionadas, como é o caso das espécies do gênero *Stenotrophomonas* que apresentam sequências quase idênticas do gene 16S rRNA, com 95,7-99,6% de similaridade (Svensson-Stadler, 2012). As linhagens B804.2015 e B903.2016 que não apresentaram como resultado de identificação a possibilidade da espécie *S. maltophilia*, foram agrupadas em um clado separado na árvore filogenética (Figura 8), próximas das espécies *S. rhizophila*, *S. bentonitica*, *S. tumulicola* e *S. chelatiphaga*. Essas linhagens foram posteriormente identificadas como *S. rhizophila* através do sequenciamento do gene 23S rRNA (Tabela 4). Portanto, apesar do sequenciamento do gene 16S rRNA não ser capaz de diferenciar todas as espécies do gênero *Stenotrophomonas*, é capaz de diferenciar as espécies *S. maltophilia* e *S. rhizophila*.

O gênero *Stenotrophomonas* possui uma estrita relação genética com o gênero *Pseudomonas* (LIN et al., 2008), o que ocasiona uma constante reclassificação das espécies desses gêneros como, por exemplo, a espécie *Pseudomonas geniculata*, reclassificada em 2021 como *Stenotrophomonas geniculata* (Rudra; Gupta, 2021). Essas reclassificações podem ser consideradas uma das limitações dos métodos genotípicos na indústria farmacêutica, já que segundo a legislação, todas as fases da “vida” de um dado, desde a sua geração inicial, passando por seu processamento, transmissão, e quando aplicável, revisão, análise, tomada de decisão, arquivamento e descarte, devem ser rastreados, incluindo os dados brutos (Brasil, 2022c). Desta forma, os bancos de dados

disponíveis no mercado que permitem a integridade de dados exigida, muitas vezes não conseguem acompanhar a velocidade das atualizações taxonômicas (Costa et al., 2022b).

Como alternativa para uma identificação mais fidedigna, foi realizada a amplificação do gene 23S rRNA utilizando os iniciadores SM1 e SM4 descritos por Whitby et al. (2000) como específicos para a espécie *S. maltophilia*. Após uso desta técnica, resultados falsos-positivos foram observados e outras espécies do gênero *Stenotrophomonas* (de acordo com a análise do 16S rDNA) foram atribuídas erroneamente a espécie *S. maltophilia*. Esta técnica já havia sido utilizada para identificar linhagens isoladas de pacientes com fibrose cística, e foi capaz de diferenciar *S. maltophilia* de outras espécies do gênero (Whitby et al., 2000). Pinot et al. (2011) também utilizaram estes iniciadores para identificar linhagens de *S. maltophilia* de origem ambiental. Contudo, linhagens de outras espécies como *S. rhizophila*, *Variovorax* spp. e *Dugesia japonica* apresentaram resultado positivo para a PCR espécie-específica para *S. maltophilia*. Para confirmar estes resultados, foi realizado um PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) utilizando os iniciadores SM1 e SM4 com a sequência do gene 23S rDNA de *S. rhizophila* (n.º de acesso: NR_122022) depositada no NCBI. Além disso, os fragmentos das linhagens B804.2015 e B903.2016 obtidas na PCR espécie-específico foram sequenciados e a partir da análise com uso da ferramenta BLAST, as linhagens foram identificadas como *S. rhizophila* (Tabela 4). Portanto, a utilização desta PCR espécie-específica parece funcionar bem para a identificação de linhagens de origem clínica, mas não possui a mesma especificidade para a identificação de linhagens de origem ambiental. Estes resultados ainda indicam que estes iniciadores tiveram o mesmo desempenho do que o sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo capazes de identificar as linhagens apenas em nível de gênero.

Em relação a técnica do MLST, foram identificados 17 ST distintos, dentre eles, os ST 34, ST 41, ST 94, ST 115, ST 212, ST 233, ST 239, ST 408 e ST 867, que já haviam sido depositados no banco de dados e os ST 915-922, que foram descritos neste estudo (Tabela 5).

A linhagem B1140.2018, identificada como ST 34, foi isolada de IFA, tendo este já sido isolado de amostra clínica na Austrália no ano 2000 (Kaiser et al., 2009). O ST 41 já foi isolado de amostras clínicas nos EUA (n=7) em 2016 e na Austrália (n=1) em 2001 (Kaiser et al., 2009). Neste estudo, esse ST foi identificado na linhagem B203.2020,

isolada de uma SIP e única classificada como formadora de biofilme fracamente aderente (Tabela 6 e Figura 13). A linhagem B1549.2015, identificada como ST 94, foi isolada de APU, tendo este ST já sido isolado de um paciente com fibrose cística na Itália (n=1) (Pompilio et al., 2011) e em amostras humanas nos EUA nos anos de 2007 e 2016 (Mojica et al., 2019). A linhagem B1807.2018, identificada como ST 115, foi isolada de uma amostra de APU, mas em outro estudo foi identificado em uma linhagem isolada de um paciente com fibrose cística na Sérvia em 2013 (Madi et al, 2016) e de amostras de sangue humano na China nos anos 2012 e 2014. O ST 212, identificado na linhagem B748.2020, foi isolado de uma amostra de validação de processo (AVP), e já foi identificado em amostras de sangue humano nos EUA (n=2) em 2013 e 2014 (Mojica et al., 2019), em ferida humana no México (n=1) em 2016, e em uma amostra de escarro na Tailândia em 2016 (Yinsai, 2020).

O ST 233 foi o mais prevalente, tendo sido identificado em três linhagens (B1117.2018, B1142.2020 e B0187.2021), duas isoladas de APU e uma de REA (Tabela 2). Essas linhagens formaram biofilmes FMA que não foram eliminados após a exposição ao álcool etílico 70% e quaternário de amônio a 0,08%/15 min (Figura 18). Esse ST já foi identificado em amostras clínicas na Austrália (n=7), Tailândia (n=2), China (n=1) e EUA (n=1) (Mojica et al, 2019); e em amostras ambientais em Madagascar em 2015. O ST 239, identificado na linhagem B1322.2018, foi isolado de APU, e já foi identificado em amostras clínicas nos EUA (n=2) (MOJICA et al., 2019) e China (n=1). O ST 408, identificado na linhagem B369.2020, foi isolado de uma amostra de SIP, e já foi identificado em uma amostra de escarro humano na China em 2015 (Duan et al., 2020).

O ST 867 foi o segundo mais frequente, tendo sido identificado nas linhagens B2022.2018 e B1053.2020, isoladas de APU e REA, respectivamente, e classificadas como FMA. Esses resultados indicam a persistência destes ST na indústria farmacêutica e que a água utilizada para a produção de reagentes pode ser a fonte de contaminação de outros produtos ao longo dos anos (Gráfico 1 e Figura 9).

A partir da análise no eBURST, os novos ST identificados neste estudo foram agrupados em CC com os ST já descritos no banco de dados considerando a variação de até dois *locus*. Os ST 915 e ST 916 formaram um CC com os ST 553 e ST 596, sendo estes oriundos de amostra ambiental e clínica. O ST 918 formou um CC com os ST 84, ST 175 e ST 482, estes já identificados em amostras clínicas, ambientais e de animais. Os

ST 919 e ST 921 formaram um CC com os ST 34 e ST 194, também já identificados em amostras clínicas. Os ST 917, ST 920 e ST 922 não formaram CC, sendo classificados como *singletons*.

Não foi possível a obtenção do ST de 17 linhagens devido à dificuldade de amplificar e/ou sequenciar os genes *mutM* e *nuoD* (Tabela 5). Para essas linhagens foram realizadas mudanças no protocolo de amplificação, como: desenho de um novo par de iniciadores, gradiente de temperatura na etapa de anelamento, alteração da concentração de MgCl₂, e adição de betaina na reação de PCR. Entretanto, mesmo após essas mudanças, não foi obtido êxito na amplificação desses genes para algumas linhagens. Para outras, foram obtidos produtos amplificados, mas após o sequenciamento, a análise dos cromatogramas revelou picos sobrepostos, impedindo a identificação do alelo.

Em geral, os genes selecionados para a tipificação pela técnica do MLST são genes de cópia única com um grau considerável de conservação na espécie a ser analisada. Entretanto, Vasileuskaya-Schulz et al. (2011) relataram que o gene *mutM*, descrito no PubMLST como um dos genes necessários para a tipificação de *S. maltophilia*, compartilha um alelo (*mutM* – 4) com várias espécies, incluindo *S. rhizophila*, *S. chelatiphaga*, *S. koreensis* e *S. dokdonensis*. Em outro trabalho, Kaiser et al. (2009) descreveram a possível transferência horizontal dos genes *guaA*, *mutM* e *nuoD* após diversas análises. Esses dados podem explicar a dificuldade de sequenciar esses genes em linhagens de origem ambiental, visto que é comum a colonização de mais de uma espécie nesses locais. Uma alternativa para este problema seria a utilização do sequenciamento do genoma completo (Rizek et al., 2018).

O ERIC-PCR é um método rápido e de menor custo que já demonstrou ser eficaz para tipificação de microrganismos para monitoramento de clones e análises investigativas (ECE, 2014). O alto valor de índice de Simpson calculado com uso desta técnica [0,997, LIC=0,991; LSC=1,003], pode estar associado ao fato que foram selecionadas 37 linhagens de perfis fenotípicos distintos no VITEK[®]2. A variedade de perfis encontrados indica mais uma vez a grande variedade genética de *S. maltophilia* e corrobora com os resultados de outros trabalhos descritos na literatura que utilizaram essa metodologia para análise de clonalidade (Juhász et al., 2014; Alcaraz et al., 2018). As linhagens B757.2018 e B748.2020 foram identificadas com 100 % de similaridade (perfil V), mas apresentaram STs distintos (ST 920 e ST 212) que não compartilham nenhum

alelo em comum (Tabela 5) e também não se agruparam próximos na árvore filogenética “*maximum likelihood*” (Figura 10). Em contraste, as linhagens B2022.2018 e B1053.2020 (perfil XVI) foram ambas identificadas como ST 867 (Figura 11). As linhagens B1142.2020, B1117.2018 e B0187.2021, identificadas como ST 233, não apresentaram 100 % de similaridade, mas foram agrupadas em um mesmo clado (Figura 11). Apesar do ERIC-PCR ser uma técnica mais rápida e com menor custo do que o MLST, ela não permite a comparação dos perfis com outros bancos de dados, apenas uma análise de clones intralaboratoriais para determinação da diversidade genética (Codjoe et al., 2019). No presente estudo, uma comparação mais robusta entre ambas as técnicas não foi possível, uma vez que não foi possível a determinação do ST de todas as linhagens estudadas.

Com exceção da B203.2020, todas as linhagens identificadas como *S. maltophilia* apresentaram biofilmes FMA (n=34; 91,9 %) ou MA (n=2; 5,4 %) em superfície de poliestireno (Tabela 6). A formação do biofilme também foi avaliada em superfície de aço inox através da MEV, na qual foi observada a formação de pequenos agregados (Figura 12-16), apesar das linhagens terem sido classificadas neste estudo como não agregativas. Essas informações podem ser de grande utilidade para a indústria farmacêutica, já que a formação desses pequenos agregados pode impactar em contaminações intermitentes em diferentes etapas da cadeia produtiva, devido ao seu desprendimento da superfície (Parenteral Drug Association, 2015a).

Entre os desinfetantes testados para a avaliação da sensibilidade do biofilme, apenas o hipoclorito 1 %/15 min foi eficaz na redução de 100 % do biofilme formado pelas linhagens testadas (Figura 18). No entanto, em superfícies de aço inox, que são geralmente utilizadas em áreas produtivas na indústria farmacêutica, não é recomendado o tratamento com desinfetantes que contém hipoclorito de sódio como princípio ativo devido ao processo de corrosão (Stokes et al., 1999). Dessa forma, outros desinfetantes e/ou tempo de contato devem ser avaliados para efetivamente eliminar o biofilme dessas superfícies.

Devido a multirresistência intrínseca de *S. maltophilia* a antibióticos e a sua capacidade de formar biofilme, as infecções causadas por esse microrganismo são consideradas difíceis de tratar (McCutcheon; Dennis 2021; Tamma et al., 2022). No presente estudo, dentre os três agentes antimicrobianos testados utilizando o método de

disco difusão, foi encontrada resistência intermediária ao SXT, um antagonista de folato, em 16,2% (B0187.2021, B316.2016, B1322.2018, B1385.2018, B757.2017 e B368.2020) das linhagens identificadas como *S. maltophilia*. A presença de resíduos de antibióticos em águas de superfície já foi relatada (LIU et al., 2022), incluindo sulfametoxazol no Rio de Janeiro, Brasil (BIANCO et al., 2022). Estas linhagens foram isoladas de amostras de APU (n=4) e SIP (n=2) (Tabela 2). Entretanto, ao realizar o E-test para determinação da MIC, as linhagens foram classificadas como sensíveis. A baixa ocorrência de linhagens resistentes na indústria pode estar relacionada, possivelmente, pelo fato da pressão seletiva do ambiente ser menor em relação a linhagens clínicas, devido ao uso constante de desinfetantes que reduzem a concentração de microrganismos nesses ambientes.

6 CONCLUSÃO

- O sistema semi-automatizado VITEK[®] 2 identificou incorretamente 7,5 % das linhagens selecionadas. O VITEK[®] MS RUO foi capaz de identificar linhagens de *S. maltophilia*, mas não identificou *S. rhizophila*, espécie alocada no mesmo gênero. Logo, se faz necessária a expansão da base de dados VITEK[®] MS RUO para que a identificação correta destas espécies seja possível.
- O sequenciamento do gene 16S rRNA e a PCR do gene 23S rRNA não diferenciaram as espécies do gênero *Stenotrophomonas*.
- Foram descritos 33 alelos novos e identificados 17 ST distintos, sendo oito novos no banco de dados. Nove (52,8 %) ST encontrados já foram isolados a partir de amostras clínicas de humanas em diferentes países, indicando que linhagens com potencial patogênico foram identificadas na indústria farmacêutica. Para 13 (35,1 %) linhagens, não foi possível o sequenciamento do alelo *mutM* e para cinco (13,4 %) linhagens não foi possível o sequenciamento do alelo *nuoD*.
- A ERIC-PCR foi considerada uma técnica satisfatória para genotipagem de linhagens de *S. maltophilia*, uma vez que todas apresentaram amplificação de bandas, podendo ser aplicada em investigação e rastreamento na indústria farmacêutica;
- Das linhagens identificadas como *S. maltophilia*, 97,3 % produziram biofilme classificado como MA ou FTA em superfície de poliestireno. Em superfície de aço inox, foi observada a formação de uma massa homogênea, com a presença de alguns grumos, apesar de todas as linhagens terem sido classificadas como não agregativas;
- O hipoclorito de sódio em concentrações $\geq 1\%/15$ min foi o desinfetante/tempo de contato que se apresentou mais eficaz para a eliminação do biofilme produzido pelas linhagens de *S. maltophilia*;
- Todas as linhagens identificadas como *S. maltophilia* foram classificadas como sensíveis aos antimicrobianos testados.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Convergência regulatória**. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/relacoes-internacionais/convergencia-regulatoria>. Acesso em: 20 mar. 2021.

ALCARAZ, E. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients exposed to invasive devices in a university hospital in Argentina: molecular typing, susceptibility and detection of potential virulence factors. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 992-1002, 2018.

AN, S.Q.; BERG, G. *Stenotrophomonas maltophilia*. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 637-638, 2018.

AMORIM, M. B. *et al.* Resurgence of measles cases in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p e33211730124, 2022.

ASSIH, E. A. *et al.* *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, p. 559-568, 2002.

BIANCO, K. *et al.* Mobile resistome of microbial communities and antimicrobial residues from drinking water supply systems in Rio de Janeiro, Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 19050, 2022.

BIOMERIEUX. **Manual**. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/produto/vitek2-compact>. Acesso em: 10 maio 2022.

BOSTANGHADIRI, N. Characterization of Phenotypic and Genotypic Diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Isolated From Selected Hospitals in Iran. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1191, 2019.

BRAGA, L. M. P. *et al.* Misidentification of *Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter* and *Paenibacillus* as *Cronobacter* spp. Isolated from a pharmaceutical industry. *In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOBIOLOGICAL*, 6., 2022. Rio de Janeiro. **Annals...** Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2022. P. 95.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1, p. 18055.

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações 30 anos/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília, ISBN 85-334-0751-3, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 73, de 21 de outubro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. **Diário Oficial da União**, 22 out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Instrução Normativa nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 16 ago. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 69, de 08 de dezembro de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, p. 43, 2014. Brasília, 09 de dezembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Instrução Normativa nº 35, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Estéreis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, edição 162, p. 74. 2019a. Brasília, 22 de agosto de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Instrução Normativa nº 36, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Insumos e Medicamentos Biológicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, edição 162, p. 79. 2019b. Brasília, 22 de agosto de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, edição 62, p. 320, 2022a. Brasília, 31 de março de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Instrução Normativa nº 138, de 30 de março de 2022b. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, edição 62, p. 367, 2022b. Brasília, 31 de março de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Instrução Normativa nº 134, de 30 de março de 2022c. Dispõe sobre as Boas Práticas de

Fabricação complementares aos sistemas computadorizados utilizados na fabricação de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, edição 62, p. 361, 2022c. Brasília, 31 de março de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde divulga cronograma do Programa Nacional de Vacinação de 2023**. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/janeiro/ministerio-da-saude-divulga-cronograma-do-programa-nacional-de-vacinacao-de-2023>. Acesso em: fev. 2023.

BROOKE, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: na emerging global opportunistic pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 2-41, 2012.

BROOKE, J. S. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2014.

CHAROENLAP, N. *et al.* Inactivation of *ahpC* renders *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to the disinfectant hydrogen peroxide. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 112, p. 809–814, 2019.

CHONG, W. H. *et al.* State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. **Infection**, v. 49, n. 4, p. 591-605, 2021.

CHURCH, D. L. *et al.* Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 4, e00053-19, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30 th ed. CLSI supplement M100, PA, USA, 2020.

CODJOE, F. S. *et al.* Genetic relatedness in carbapenem-resistant isolates from clinical specimens in Ghana using ERIC-PCR technique. **PloS One**, v. 14, n. 9, 2019.

CORTES, M. A. *et al.* Public vaccine manufacturing capacity in the Latin American and Caribbean region: current status and perspectives. **Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 40, n.1, p. 3-14, 2012.

COSTA, L. V. *et al.* Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada de uma indústria farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 98, p. 1919-1937, 2017.

COSTA, P.V. *et al.* Cytotoxicity profile of Cronobacter species isolated from food and clinical specimens in Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 130, n. 5, p. 1758-1769, 2021.

COSTA, L. V. *et al.* Assessment of VITEK[®] 2, MALDI-TOF MS and full gene 16S rRNA sequencing for aerobic endospore-forming bacteria isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of Microbiological Methods**, v. 194, 106419, 2022a.

COSTA, L.V. *et al.* MALDI-TOF MS database expansion for identification of *Bacillus* and related genera isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of Microbiological Methods**, v. 203, p. 106625, 2022b.

CROXATTO, A. *et al.* Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

MARQUES, C. M. S.; RABELO, C. P. G. Competências para atuação em vigilância sanitária: abordagem metodológica. **Vigil Sanit Debate**, v. 8, n. 4, p. 3-13, 2020.

DUAN, Z. *et al.* Molecular epidemiology and risk factors of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a Chinese teaching hospital. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, p. 294, 2020.

DUMONT, A. L. *et al.* Type II Secretion-Dependent Degradative and Cytotoxic Activities Mediated by *Stenotrophomonas maltophilia* Serine Proteases StmPr1 and StmPr2. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3825-3837, 2015.

ECE, G. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* Pseudo-outbreak at a University Hospital Bronchoscopy Unit in Turkey. **The West Indian Medical Journal**, v. 63, n. 1, p. 59-61, 2014.

EISSA, M. Bioburden Control in the Biopharmaceutical Industry. **Biopharm International**, v. 30, n. 9, p. 24-27, 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Science Medicines Health. **Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container**. 2019. (EMA/CHMP/CVMP/QWP/850374/2015). Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-sterilisation-medicinal-product-active-substance-excipient-primary-container_en.pdf. Acesso em: .

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **The Rules Governing Medicinal Products in the European Union**: v. 4 - European Union Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products. Bruxelles, 2022.

FEIL E, *et al.* eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, v. 86, p. 1518-30, 2004.

FINKMANN, W. *et al.* Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov.

International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 50, p. 273-282, 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry sterile drug products produced by aseptic processing**: current good manufacturing practice. Bethesda, MD, USA: U.S. Food and Drug Administration, 2004.

FOSTER, N. F. *et al.* Cross-reaction of *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* species in a 23S rRNA gene-directed PCR for detection of *S. maltophilia*. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 12, 2008.

FUNASA. **Cronologia Histórica da Saúde Pública**: uma visão histórica da saúde brasileira. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/cronologia-historica-da-saude-publica>. Acesso em: 20 fev. 2023.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Vacinas contra Covid-19**. Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/vacinas-covid19>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2023.

GOMES, I. B. *et al.* The action of chemical and mechanical stresses on single and dual species biofilm removal of drinking water bacteria. **The Science of the Total Environment**, v. 631-632, p. 987-993, 2018.

GRUNDMANN, H.; Tanner, G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4190-4192, 2001.

HANDA, Y. *et al.* *Stenotrophomonas tumulicola* sp. nov., a major contaminant of the stone chamber interior in the Takamatsuzuka Tumulus. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1119-1124, 2016.

HEYLEN, K. *et al.* *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, p. 2056-2061, 2007.

HU, L. F. *et al.* Increase in the Prevalence of Resistance Determinants to Trimethoprim/Sulfamethoxazole in Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in China. **PloS One**, v. 11, n. 6, 2016.

HU, L. F. *et al.* Surveillance of antimicrobial susceptibility patterns among *Stenotrophomonas maltophilia* isolated in China during the 10-year period of 2005-2014. **Journal of Chemotherapy**, v. 30, n. 1, p. 25-30, 2018.

HUGH, R.; RYSCHENKOW, E. *Pseudomonas maltophilia*, an Alcaligenes-like species. **Journal of General Microbiology**, v. 26, p. 123-132, 1961.

HUNTER, P. R. E GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **Relatório de atividades**. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/images/stories/relatorio-atividades-2020.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2022.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **Balanco da gestão de Bio-Manguinhos de 2017 a 2021**. Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/images/relatorio-balanco-gestao-web-vf-21.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2022.

JONES, R. N. *et al.* Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains of non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 6, p. 551-556, 2003.

JUHÁSZ, E. *et al.* Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, p. 333.

KAISER, S. *et al.* A *Stenotrophomonas maltophilia* Multilocus Sequence Typing Scheme for Inferring Population Structure. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 9, 2009.

KAPARULLINA, E. *et al.* *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov., a new aerobic EDTA-degrading bacterium. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, n. 3, p. 157-62, 2009.

KARABA, S. M. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* encodes a type II protein secretion system that promotes detrimental effects on lung epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 9, p. 3210-3219, 2013.

KHAN, A. *et al.* Evaluation of the Vitek 2, Phoenix, and MicroScan for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n.9, 2021a.

KHAN, A. *et al.* Evaluation of the Performance of Manual Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and Disk Breakpoints for *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 5, 2021b.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27-35, 2000.

KIM, H. B. *et al.* *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, p. 1522-1526, 2010.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LEE, M. *et al.* *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, p. 598-604, 2011.

LIMA, A. M. B. *et al.* Origens históricas da vacinação no Brasil: Dossiê Temático: Saúde e Sociedade: diálogos interdisciplinares. **Científic@: Multidisciplinary Journal**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2021.

LIN, C. W. *et al.* Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 393-398, 2008.

LIU, J. *et al.* Occurrence and distribution of antibiotics in surface water. **Ecotoxicology**, v. 31, n. 7, p. 1111-1119, 2022.

MADI, H. *et al.* Genotypic and Phenotypic Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains from a Pediatric Tertiary Care Hospital in Serbia. **PLoS One**, v. 11, n. 10, 2016.

MAGILL, S. S. *et al.* Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.

MAIDEN, M. C., *et al.* MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728-36, 2013.

MAZZOLA, *et al.* Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. **BMC infectious diseases**, v. 6, n. 131, 2006.

MATTOSO, J. *et al.* Contribuições do sistema de controle de dados relacionados 95iocardaga para a melhoria da segurança em produtos da indústria (bio)farmacêutica: uma revisão sistemática. **Revista Científica do Centro Universitário Barra Mansa**, n. 48, p. 139-158, 2023.

McCUTCHEON, J.G.; DENNIS, J.J. The Potential of Phage Therapy against the Emerging Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1057, 2021.

McEWAN, N. R. *et al.* Evaluation of the microbiome of decaying alder nodules by next generation sequencing. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 28, n. 1, p. 14-19, 2017.

MICROBIAL characterization, identification, and strain typing. *In*: THE UNITED States Pharmacopeia. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2021.

MICROSEQ™ FULL GENE 16S rDNA IDENTIFICATION. **User guide**: applied biosystems. 2021. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/4393009_MSIDFullGene_UG.pdf. Acesso em 15 de fevereiro de 2023.

MOJICA, M. F. *et al.* Population Structure, Molecular Epidemiology, and β -Lactamase Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in the United States. **American Society for Microbiology**, v. 10, n. 4, 2019.

MONTOYA-HINOJOSA, E. *et al.* Discrimination of biofilm-producing *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight. **PloS One**, v, 15 n. 12, 2020.

MOREIRA, F. M. *et al.* Identificação de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Científica do Centro Universitário Barra Mansa**, n.46, p. 124-144, 2021.

MOREIRA, F. M. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF MS, sequencing of D2 LSU rRNA and internal transcribed spacer regions (ITS) for the identification of filamentous fungi isolated from a pharmaceutical facility. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 234, 2023.

NOGUEIRA, R. A. S. B. *et al.* A revolta da vacina e seus impactos: Dossiê Temático: Saúde e Sociedade: diálogos interdisciplinares. **Científic@: Multidisciplinary Journal**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2021.

OLIVEIRA-GARCIA, D. *et al.* Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 625-636, 2003.

ORTIZ-PRADO, E. *et al.* Vaccine market and production capabilities in the Americas. **Trop Dis Travel Med Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2021.

OUATTARA, A. S. *et al.* Transfer of *Pseudomonas pictorum* Gray and Thornton 1928 to genus *Stenotrophomonas* as *Stenotrophomonas pictorum* comb. nov., and emended description of the genus *Stenotrophomonas*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1894-1900, 2017.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. Bioburden and biofilm management in pharmaceutical manufacturing operations. 2015a. (Technical Report, n. 69).

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. **Fundamentals of cleaning and disinfection programs for aseptic manufacturing facilities**. 2015b. (Technical Report No. 70).

PARTE, A.C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 5607-5612, 2020.

PAGES, D. *et al.* Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PloS One**, v. 3, n. 2, 2008.

PALLERONI, N. J.; BRADBURY, J. F. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 606-609, 1993.

PINOT, C. *et al.* Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1185-1193, 2011.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. São Paulo, 2015.

PINSKI, A. *et al.* Comparative Genomics of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Stenotrophomonas rhizophila* Revealed Characteristic Features of Both Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4922, 2020.

POMPILIO, A. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 159, 2011.

RAAD, M. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in critical COVID-19 patients. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 3392, 2023.

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, 2015.

RAMOS, P. L. *et al.* Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, p. 926-931, 2011.

RYAN, R. *et al.* The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, p. 514–525, 2009.

RIZEK, C. F. *et al.* Multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: Description of new MLST profiles and resistance and virulence genes using whole-genome sequencing. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 15, p. 212-214, 2018.

RUDRA, B.; GUPTA, R. S. Phylogenomic and comparative genomic analyses of species of the family Pseudomonadaceae: Proposals for the genera *Halopseudomonas* gen. nov. and *Atopomonas* gen. nov., merger of the genus *Oblitimonas* with the genus *Thiopseudomonas*, and transfer of some misclassified species of the genus

- Pseudomonas* into other genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 9, 10.1099/ijsem.0.005011, 2021.
- SÁNCHEZ-CASTRO, I. *et al.* *Stenotrophomonas bentonitica* sp. nov., isolated from bentonite formations. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 8, p. 2779-2786, 2017.
- SANDLE, T. Improving microbiological assurance for bioburden tests. **European Pharmaceutical Review**, v. 21, n. 3, p. 41-44, 2016.
- SELIM, N. A. *et al.* Monitoring and controlling bacteria in pharmaceutical industries water system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 1079-1090, 2020.
- STEPANOVIC, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.
- STOKES, O. W. *et al.* Corrosion in stainless-steel and nickel-titanium files. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 1, p. 17–20, 1999.
- STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
- SUTTON, S. V. W.; CUNDELL, A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharmaceutial Forum**, v. 30, n. 5, p. 1884-1894, 2004.
- SVENSSON-STADLER, L. A. *et al.* *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by *gyrB* sequence analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 327, n. 1, p. 15–24, 2012.
- SWINGS, J. *et al.* Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.33, n.2, p. 409–413, 1983.
- TAMMA, P. D. *et al.* Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of AmpC β -Lactamase-Producing Enterobacterales, Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. 12, p. 2089-2114, 2022.
- TAMURA K. *et al.* MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.
- TSUCHIDA, S. *et al.* Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4775, 2020.

UMEDA, N. S. *et al.* Phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. strains isolated from foods and clinical specimens in Brazil. **Food Research International**, v. 102, p. 61-67, 2017.

VAN BELKUM, A. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 1-46, 2007.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* as a tracking tool for investigation in a pharmaceutical industry. *In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOBIOLOGICAL*, 5., 2021. Rio de Janeiro. **Annals...** Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, p. 48, 2021a.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Caracterização molecular e avaliação da formação e tolerância a biocida do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Revista Científica do Centro Universitário Barra Mansa**, v. 23, n. 44, p. 193-205, 2021b.

VASILEUSKAYA-SCHULZ, Z. *et al.* Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 35-9, 2011.

VERSALOVIC, J. *et al.* Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

YANG, H. C. *et al.* *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, p. 81-4, 2006.

YINSAI, O. *et al.* Genotypic Diversity, Antibiotic Resistance, and Virulence Phenotypes of *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates from a Thai University Hospital Setting. **Antibiotics (Basel)**, v. 12, n. 2, p. 410, 2023.

YOON, S. H. *et al.* Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 2017.

WATER for Pharmaceutical Purposes. *In: THE UNITED States Pharmacopeia* 31. National Formulary 26. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2020.

WEBER, M. *et al.* *Stenotrophomonas lactitubi* sp. nov. and *Stenotrophomonas indicatrix* sp. nov., isolated from surfaces with food contact. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1830-1838, 2018.

WEBER J, *et al.* Continuous Microbiological Environmental Monitoring for Process Understanding and Reduced Interventions in Aseptic Manufacturing. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 73, n. 2, p. 121-134, 2019.

WHITBY, P. W. *et al.* Identification and Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-Directed PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4305–4309, 2000.

WOLF, A. *et al.* *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, p. 1937-1944, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Annex 6. Good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products. **WHO Technical Report Series**, 961, p. 261-284, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. **World Health Organization**, Switzerland, 2017.

WU, G. *et al.* *Luteimonas huabeiensis* sp. nov., isolated from stratum water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3352–3357, 2013.

WU, H. Y. *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19) associated bacterial coinfection: Incidence, diagnosis and treatment. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, vol. 55, n. 6, 2022.

ZHOU, Z. *et al.* GrapeTree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. **Genome Research**, v. 28, p. 1395-1404, 2018.

ANEXO A -ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

LAGE, R. V. S.; COSTA, P. V.; COSTA, L. V.; VILLAS-BÔAS, M. H. S.; BRANDÃO M. L. L. Diversidade de cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas entre 1958 e 2021 e genotipadas por *Multilocus Sequence Typing*. **Revista Científica do Centro Universitário Barra Mansa**, v. 23, p. 129-141, 2021.

DIVERSIDADE DE CEPAS DE *Stenotrophomonas maltophilia* ISOLADAS ENTRE 1958 E 2021 E GENOTIPADAS POR *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING*

DIVERSIDAD DE CEPAS de *Stenotrophomonas maltophilia* AISLADAS ENTRE 1958 Y 2021 Y GENOTIPADO POR *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING*

DIVERSITY OF STRAINS OF *Stenotrophomonas maltophilia* ISOLATED BETWEEN 1958 AND 2021 AND GENOTYPED BY *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING*

Autor 1: Rebeca Vitória da Silva Lage

Graduada em Ciências Biológicas, Mestranda em Vigilância Sanitária, Laboratório de Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7131-6155>, E-mail: rebeca.lagee@gmail.com

Autor 2: Paula Vasconcelos Costa

Graduada em Ciências Biológicas, Técnica em Operações Farmacêuticas, Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1297-2136>, E-mail: paulavasconcelos@gmail.com

Autor 3: Luciana Veloso da Costa

Doutora em Vigilância Sanitária, Tecnologista em Saúde Pública, Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1873-4056>, E-mail: luciana.costa@bio.fiocruz.br

Autor 4: Luiza Vasconcelos

<https://orcid.org/0000-0002-0849-6851>
Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Saneantes, INCQS/Fiocruz,
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
luiza.vasconcelos@msn.com

Autor 5: Samara Silva

<https://orcid.org/0000-0002-7527-7659>
Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
Graduanda em Farmácia pelo Instituto Federal do Rio de Janeiro
samara.verly@bio.fiocruz.br

Autor 6: Maria Helena Simões Villas Bôas

Doutora em Ciências, Tecnologista em Saúde Pública Senior, INCQS/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1626-7650>, E-mail: maria.villas@incqs.fiocruz.br

Autor 7: Marcelo Luiz Lima Brandão

Doutor em Vigilância Sanitária, Pesquisador em Saúde Pública, Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1121-7312>, E-mail: marcelo.brandao@fiocruz.br

ANEXO B - RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

COSTA, P. V.; LAGE, R. V. S.; COSTA, L. V.; SILVA, S. V.; VASCONCELLOS, L. Diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated between 1958 and 2020 and genotyped by *Multi-locus Sequence Typing*. In: I Simpósio de Microbiologia de Rondônia: Saúde, Ambiente e Inovação, 2021, Rondônia. *Annals...* SIMICRON, 2021.



ISBN: 978-65-86861-91-4

DIVERSITY OF STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA ISOLATED BETWEEN 1958 AND 2020 AND GENOTYPED BY MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING

I Simpósio de Microbiologia de Rondônia: Saúde, Ambiente e Inovação., 1ª edição, de 23/03/2021 a 25/03/2021
ISBN dos Anais: 978-65-86861-91-4

COSTA; Paula Vasconcelos ¹, LAGE; Rebeca Vitória ², COSTA; Luciana Veloso ³, VASCONCELLOS; Luiza ⁴, SILVA; Samara Verly ⁵, BRANDÃO; Marcelo Luiz Lima ⁶

RESUMO

Stenotrophomonas maltophilia is an opportunistic pathogen associated with respiratory infections in humans. This microorganism has clinical relevance due to the emergence of multiresistance strains decreasing susceptibility to common use antibiotics. In addition, *S. maltophilia* produces biofilm that provides more protection against several external threats and makes it difficult to remove it from surfaces. The objective of this study was to evaluate the *in silico* data regarding *S. maltophilia* strains (n=931) isolated and characterized by multi-locus sequence typing (MLST) available in the PubMLST database isolated between 1958 and 2020 (last access 22/01/2021). The strains with complete MLST allelic profile in the database (n=929) were analyzed using eBURST algorithm. The Simpson's index (SI) was applied to calculate the MLST resolution power for typing *S. maltophilia* strains. The 929 strains were assigned to 674 STs, a ratio of 1.4 strain/ST, and the calculated SI was 0.998. This specie is present on five continents, the majority (n=417, 44.8%) from Asia followed by Europe (n=243, 26.1%), America (n=212, 22.8%), Oceania (n=51, 5.5%), Africa (n=7, 0.75%) and one (0.1%) from an unknown country. Regarding the source of isolation, 811 (87.1%) were from humans, 67 (7.1%) from environment, 39 (4.1%) from animal, eight (0.8%) from clinical environment, and six (0.6%) from unknown sources. After eBURST analysis, 674 STs formed 90 groups (n=505) with single-locus variant (SLV) and/or double-locus variant clonal complexes which shared five or more allelic profiles, and 331 STs (n=424) were identified as singletons. Five hundred and eighty (86.0%) STs were associated with human infections, being isolated from clinical specimens as blood, sputum, conjunctivitis, vascular ulcer and surgical wound. Regarding America, Brazil was the only South America country with deposited strains (n=10, 1.1%). The strains were isolated in the southeast and northeast region and seven STs were identified: ST144 (n=1), ST172 (n=1), ST173 (n=1), ST264 (n=4), ST473 (n=1), ST474 (n=1), and ST552 (n=1). Four STs (ST144, ST172, ST173, and ST264) were isolated from human infections in São Paulo and Rio de Janeiro and are unique in the database. ST473, ST474 and ST552 were isolated from animal and environmental sources. ST144 belongs to Group 31 and it is the dominant ST. It is a SLV of ST107 and ST408, both isolated from humans in South Korea and China, respectively. The others STs were identified as singletons and are unique in the database. ST264 was the most prevalent in Brazil and was isolated from the sputum of a single non-hospitalized cystic fibrosis

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) - campus Rio de Janeiro, paula.vasconcelos@gmail.com
² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) - campus Rio de Janeiro, rebecca.lage@gmail.com
³ Biomanguinhos/Fiocruz, luciana.veloso@fiocruz.br
⁴ Biomanguinhos/Fiocruz, luiza.vasconcelos@fiocruz.br
⁵ Biomanguinhos/Fiocruz, samara.verly@gmail.com
⁶ Biomanguinhos/Fiocruz, marcelo.brandao@fiocruz.br

LAGE, R. V. S.; COSTA, L. V.; MATTOSO, J. M. V.; VILLAS-BÔAS, M. H. S.; BRANDÃO, M. L. L. Phenotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* as a tracking tool for investigation in a pharmaceutical industry. *In: II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas, 2021. Annals... CONCIFARMA, 2021.*



CONCIFARMA
CONGRESSO ONLINE NACIONAL
DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

01 a 05 de Junho 2021

ISBN Nº: 978-65-89908-34-0

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA AS A TRACKING TOOL FOR INVESTIGATION IN A PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas, 2ª edição, de 01/06/2021 a 04/06/2021
ISBN dos Anais: 978-65-89908-34-0

LAGE; Rebeca Vitória da Silva Lage¹, COSTA; Luciana Veloso da², MATTOSO; Josiane Machado Vieira³, VILLAS-BOAS; Maria Helena Simões⁴, BRANDÃO; Marcelo Luiz Lima⁵

RESUMO

Stenotrophomonas maltophilia is an opportunist human pathogen that represents a risk when found in microbiological analysis during the production chain of pharmaceuticals. The objective of this study was to evaluate the phenotypic profile of *S. maltophilia* strains as a tool for investigation in a pharmaceutical industry. Two hundred and sixty-four *S. maltophilia* strains isolated from 16 different areas (codified as A-P), from 2014-2021, from 10 different types of samples were evaluated: purified water (PWI, n=141), intermediate process solutions (IPS, n=48), active pharmaceutical ingredients (API, n=24), water for injection (WFI, n=16), 13 validation process samples (SVP, n=13), potable water (PTW, n=8), reagents (REA, n=7), environmental monitoring (EMO, n=4), intermediate product (INP, n=2), and final product (FPR, n=1). The strains were identified using the Vitek®2 with reliability ≥89%, and phenotypic profile resulted from 47 biochemical tests were categorized and evaluated with Bionumerics 8.0 for similarity coefficient calculation using Pearson correlation and clustering method UPGMA. The profiles that presented similarity ≥85% were clustered in the same group. The Simpson's index (SI) was applied to calculate the resolution power of Vitek®2 for typing strains. The 264 strains were assigned in 59 phenotypic profiles (I-LIX) and the calculated SI was 0.91. Similarity analysis showed eight groups and three singletons: Group 1 (Profiles I, II, XXXVI, XXXIX, XLIII, LI, LII and LIII, n=23), Group 2 (Profiles XLIV and XLVI, n=2), Group 3 (Profiles V, XII, XIII, XVII, XX, XXXIII, XXXIV, XLI, XLVII, XLVIII, L, LIV and LV, n= 65), Group 4 (Profiles III, VII, XI, XIX, XVIII, XXV, XXVI, XXVII, XXIX, XXX, XXXV, XXXVIII, XLII, XLV and XLIX, n=132), Group 5 (Profiles IV, VIII, IX, X, XV, XVI and XXVIII, n=22), Group 6 (Profiles XIV, XXXI, XXXII, LVI, LVII and LIX, n=9), Group 7 (Profiles XXI and XXII, n=3), Group 8 (Profiles VI, XXIII and LVIII, n=3), Singleton 1 (Profile XL, n=1), Singleton 2 (Profile XXXVII, n=3) and Singleton 3 (Profile XXIV, n=1). Regarding the largest groups identifies (n>20), Group I was isolated in five areas mainly from water samples (n=13, 56.5%) and IPS (n=9, 39.1%). Group 3 was isolated in 11 areas mainly from water samples (n=41, 63.1%) and IPS (n=14, 21.5%), from 2015-2021. Group 4, the largest group, was found in 14 areas mainly from water samples (n=87, 65.9%) and IPS (n=25, 18.9%), from 2015-2021. These results indicate that the water used to produce IPS can be the source of contamination. Groups 5 was isolated in six areas mainly from water samples (n=12, 54.5%) and API (n=8, 36.4%) from 2015-2019, indicating that the water used to produce the API can be the source of

¹ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz, rebecca.lage@incc.fiocruz.br

² Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz, luciana.veloso@incc.fiocruz.br

³ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz, josiane@incc.fiocruz.br

⁴ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz, maria.helena@incc.fiocruz.br

⁵ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz, marcelo.brandao@incc.fiocruz.br

MIRANDA, R.; MONTEIRO, G. M.; VASCONCELLOS, L.; SILVA, S. V.; COSTA, L. V.; CONCEIÇÃO, G. M. S.; SILVA, A. P. R.; SILVA, I. B.; VILLAS-BÔAS, M. H. S.; BRANDÃO, M. L. L. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm tolerance to disinfectants used in a pharmaceutical industry. *In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOBIOLOGICALS*, 2022, Rio de Janeiro. **Annals of the symposium: vaccines, biopharmaceuticals, in vitro diagnosis, management, other related themes**, p. 61, 2022.



BIO_20 - Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm tolerance to disinfectants used in a pharmaceutical industry

Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda¹; Giovanna Merrelho Monteiro¹; Luiza Vasconcellos¹; Samara Verly da Silva¹; Luciana Veloso da Costa¹; Greice Maria Silva da Conceição¹; Ana Paula Roque da Silva¹; Igor Barbosa da Silva¹; Maria Helena Simões Villas Bôas²; Marcelo Luiz Lima Brandão¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²Fiocruz/INCQS.

Introduction: Biofilms are formed by microorganisms that grow in aggregate, usually attached to biotic and abiotic surfaces, forming a sessile community embedded in a self-produced extracellular polymeric matrix. Biofilm-producing microorganisms, such as the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*, acquire greater resistance to the action of physical and chemical agents, which may contribute to the prevalence of these pathogens in some environments. The exposure time, as well as the concentration of the disinfectant used, are important factors for the effective elimination of contaminants.

Objective: This study aimed to evaluate the biofilm tolerance formed by *S. maltophilia* strains against disinfectants used in the pharmaceutical industry, in order to determinate preventive and corrective measures to eliminate these bacteria.

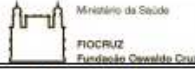

Methodology: The biofilm formation assay was performed in 96-well polystyrene plates in two different temperatures (22.5 and 37.0°C). Three independent experiments were performed in triplicate for each strain (n=39). Strains classified as moderately and strongly adherent were selected to evaluate the biofilm tolerance against the following disinfectants: ethyl alcohol 70%/15 min, sodium hypochlorite 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0% and 2.5%/15 min, quaternary ammonium 0.05% and 0.08%/ 20 min. Differences in the degree of biofilm formation were examined by Wilcoxon signed ranks test. *P*-values < 0.05 were considered significant.

Results: Thirty-six (92.3%) strains were classified as moderately or strongly adherent and no significant statistical difference between the temperatures of incubation was observed (*p* = 0.5271). Exposure to alcohol 70% (0/36) was not able to reduce the biofilm formed (*p* = 1.00). Quaternary ammonium (2/36, 5.5%) (*p* ≤ 0.0023), sodium hypochlorite at 0.1% and 0.5% were able to reduce the biofilm in 38.8% and 94.4% (*p* ≤ 1.32x10⁻⁶), respectively. In concentrations ≥ 1.0%, sodium hypochlorite eliminated 100% of biofilms.

Conclusion: In conclusion, sodium hypochlorite at concentrations ≥ 1.0 %/15 min seems to be the most effective disinfectant for *S. maltophilia* biofilm elimination. As sodium hypochlorite cannot be applied in certain surfaces due to its corrosive action, other studies are necessary in order to find alternative disinfectants.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*; Microbiological control; Biofilm elimination

ANEXO C - ELABORAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA PESQUISA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATRIZ DE POLIESTIRENO E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO BIOFILME FRENTE A DESINFETANTES

		MÉTODO ANALÍTICO
PESQUISA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATRIZ DE POLIESTIRENO E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO BIOFILME FRENTE A DESINFETANTES		
UO RESP.: DEQUA LACOM	Número: MTA0572_000MAN	Visualização PDF - Confidencial

1- OBJETIVO

Descrever a metodologia para avaliação da formação de biofilme em matriz de poliestireno e da tolerância do biofilme frente a desinfetantes.

2- ABRANGÊNCIA

Aplica-se ao LACOM (Laboratório de Controle Microbiológico) do Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA).

3- SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*
 AM – amostra
 ASC – Ágar Sangue de Carneiro
 BHI – *Brain Heart Infusion*
 CD – controle positivo do processo de desinfecção
 CN – controle negativo
 CP – controle positivo
 CSB - Cabine de Segurança Biológica
 D.O. - densidade óptica
 FA - fracamente aderente
 FMA - fortemente aderente
 °C - Grau Celsius
 h - horas
 MA - moderadamente aderente
 min – minutos
 mL - mililitro
 µL – microlitro
 nm - nanômetro
 NA – não aderente
 rpm – rotações por minuto
 seg – segundos
 TSA - Ágar Caseína de Soja

4- DEFINIÇÕES

BIOFILME – Formado por microrganismos que crescem agregados, formando uma comunidade sésil incorporada em uma substância polimérica extracelular autoproduzida. É caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato. (PDA, 2015a).


DESINFECÇÃO – Processo de eliminação de quase todos os microrganismos patogênicos reconhecidos, mas não necessariamente todas as formas microbianas (por exemplo, esporos bacterianos) em objetos inanimados (PDA, 2015a).

DESINFETANTES – Os desinfetantes apresentam um maior nível de eficácia que os sanitizantes, e a taxa de eliminação irá depender do inóculo e do tempo de contato. Desinfetantes irão tipicamente eliminar os microrganismos vegetativos com exceção dos microrganismos formadores de esporos. Exemplos incluem quaternário de amônio e componentes fenólicos (PDA, 2015b).

5-CUIDADOS E EPI

Todas as etapas descritas neste procedimento devem ser realizadas com a utilização de luvas estéreis descartáveis.

Data de Ativação 17/10/2022	Data de validade 17/10/2025	Cód. SIGDA 433.1	Página 1/10
--------------------------------	--------------------------------	---------------------	----------------

 Ministério de Saúde PROCRUZ Fundação Oswaldo Cruz	 Instituto de Tecnologia em Alimentos Bio-Manguinhos	MÉTODO ANALÍTICO
Visualização PDF - Confidencial		PESQUISA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATRIZ DE POLIESTIRENO E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO BIOFILME FRENTE A DESINFETANTES

11.2- Responsáveis

RESPONSABILIDADE		NOME	ASSINATURA	DATA
LACOM	EDITOR	REBECA VITORIA DA SILVA LAGE		14/09/2022
LACOM	REVISOR	LUCIANA VELOSO DA COSTA		15/09/2022
LACOM	REVISOR	MARCELO LUIZ LIMA BRANDÃO		15/09/2022
LACOM	APROVADOR	IGOR BARBOSA DA SILVA		21/09/2022



Versão 04