

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: paulavasconcelosc@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 Vasconcellos

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

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar os dados *in silico* de cepas de *S. maltophilia* (n=974) caracterizadas por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) disponíveis no banco PubMLST isoladas entre 1958 e 2020. As cepas com perfil alélico completo (n=972) foram analisadas utilizando a árvore filogenética *neighbor-joining*, a ferramenta *minimum spanning tree* e o algoritmo eBURST. O índice de Simpson foi aplicado para calcular o poder de resolução do MLST para tipificação. A maioria das cepas depositadas são de origem clínica (87,6%) e oriundas da Ásia (47,1%). As cepas de *S. maltophilia* apresentaram alta diversidade genética quando avaliadas, sendo identificadas em 679 ST distintos, uma taxa de ~1,4 cepa/ST. O índice de Simpson calculado foi de 0,99. O Brasil possui 10 cepas depositadas classificadas em sete ST distintos, sendo quatro isolados de infecções em humanos. Em conclusão, o MLST apresentou-se como uma ferramenta poderosa para investigações epidemiológicas de cepas de *S. maltophilia*.

Palavras-chave: Epidemiologia. MLST. Caracterização molecular. *Stenotrophomonas maltophilia*.

RESUMEN: El propósito de este estudio fue evaluar datos *in silico* de cepas de *S. maltophilia* (n=974) caracterizadas por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) disponibles en PubMLST aisladas entre 1958 y 2020. Cepas con perfil alélico completo (n=972) fueron analizadas utilizando el árbol filogenético *neighbor-joining*, la herramienta *minimum spanning tree* y el algoritmo eBURST. Se aplicó el índice de Simpson para calcular el poder de resolución MLST para la mecanografía. La mayoría de las cepas depositadas son de origen clínico (87,6%) y de Asia (47,1%). Las cepas de *S. maltophilia* mostraron una alta diversidad genética cuando se evaluaron, y se identificaron en 679 ST distintas, una tasa de ~ 1,4 cepa/ST. El índice de Simpson calculado fue 0,99. Brasil tiene 10 cepas depositadas, clasificadas en siete ST diferentes, cuatro de las cuales están aisladas de infecciones en humanos. En conclusión, el MLST se presentó como una poderosa herramienta para las investigaciones epidemiológicas de las cepas de *S. maltophilia*.

Palabras clave: Epidemiología. MLST. Caracterización molecular. *Stenotrophomonas maltophilia*.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate *in silico* data from *S. maltophilia* strains (n=974) characterized by Multilocus Sequence Typing (MLST) available in the PubMLST database isolated between 1958 and 2020. Strains with full allelic profile in the database (n=972) were analyzed using *neighbor-joining* phylogenetic tree, the *minimum spanning tree* tool, and the eBURST algorithm. Simpson's index was applied to calculate the MLST resolving power for typing. The majority of strains deposited was from clinical origin (87.6%) and from Asia (47.1%). The *S. maltophilia* strains showed high genetic diversity when evaluated, being identified in 679 different ST, a ratio of ~1.4 strain/ST. The Simpson's index calculated was 0.99. The Brazil possess 10 strains deposited identified in seven different ST, being four isolated from human infections. In conclusion, the MLST seems to be a powerful tool for epidemiological investigations of *S. maltophilia* strains.

Keywords: Epidemiology. MLST. Molecular characterization. *Stenotrophomonas maltophilia*.

1 INTRODUÇÃO

Stenotrophomonas maltophilia é um bacilo Gram-negativo, não fermentador e pertencente à família Xanthomonadaceae. É considerado um patógeno bacteriano oportunista amplamente difundido e resistente a múltiplas drogas (SOSTARICH et al., 2008; CHANG et al., 2015), estando mais comumente associado a infecções respiratórias em humanos (MOJICA et al., 2019). *S. maltophilia* possui uma alta capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, podendo facilmente aderir as superfícies em ambientes hospitalares (COSTA, 2014; ANDRADE, 2017). O biofilme produzido fornece uma estrutura de proteção contra condições de estresse, o que facilita a sua colonização e a resistência aos antibióticos, tornando mais difícil a sua eliminação (MONTROYA et al., 2020).

A espécie possui grande relevância clínica no Brasil e no mundo devido ao surgimento de cepas multirresistentes e ao seu difícil tratamento e erradicação em ambientes de assistência à saúde (ANVISA, 2017; TRIFONOVA; STRATEVA 2019). A infecção por *S. maltophilia* possui como fatores de risco causas subjacentes que comprometam o sistema imune como fibrose cística, transplante de órgãos, hospitalização prolongada e internação em unidades de terapia intensiva (UTI) (CHANG et al., 2015). Estudos recentes também demonstraram a prevalência de *S. maltophilia* em pacientes hospitalizados com COVID-19 chegando a ser isolada em 24,5% dos pacientes (BAIOU et al., 2021). Esta espécie está entre as espécies listadas nas quais a resistência é de maior preocupação para a saúde pública (WHO, 2021), isso porque *S. maltophilia* possui genes de resistência aos antibióticos inerentes e adquiridos (ADEGOKE; STENSTROM; OKOH; 2017).

Embora o uso de antibióticos seja ineficaz para o tratamento da COVID-19, eles ainda são prescritos devido a possibilidade de uma infecção bacteriana secundária durante o curso da doença (LANGFORD et al., 2020). O uso indiscriminado de antibióticos pode predispor os pacientes com COVID-19, especialmente aqueles que estão gravemente enfermos, à sepse por infecções bacterianas multirresistentes secundárias (CHONG et al., 2021). Dessa forma, o isolamento e a identificação dessa cepa em pacientes hospitalizados com COVID-19 são de grande importância para a saúde pública, já que uma análise apropriada e sistemática desses pacientes deve ser implementada para escolha dos antibióticos adequados, com objetivo de aumentar a sobrevivência dos pacientes e limitar a disseminação de bactérias resistentes aos medicamentos (MIRZAEI et al., 2020).

Vários métodos de identificação podem ser utilizados para discriminar *S. maltophilia* de outras espécies. Dentre eles, existem os que se baseiam na caracterização fenotípica como o VITEK® 2, que é composto por testes bioquímicos miniaturizados em cartões específicos para determinados grupos bacterianos (RAVE et al., 2019; LAGE et al., 2021; BIOMÉRIEUX, 2021). Outro método muito utilizado é *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS), que se baseia na diferenciação de perfis proteicos para a identificação e caracterização de microrganismos (LOONEN et al., 2012; GAUTAM et al., 2017). Nesse caso, a amostra é ionizada por um feixe de laser sobre uma matriz cristalizada. Esses íons são conduzidos por um campo elétrico e separados de acordo com seu tempo de voo, gerando espectros de massa da amostra analisada. O perfil de espectros gerado é comparado com o perfil de diversas espécies presentes no banco de dados, gerando um resultado associado a um nível de confiança (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB; 2012). Contudo estas técnicas identificam as cepas até o nível hierárquico de espécie, e em casos de investigações epidemiológicas, outras técnicas de tipificação podem ser necessárias para elucidação da investigação (VASCONCELOS et al., 2021; LAGE et al., 2021).

Os métodos genotípicos baseados no sequenciamento de ácidos nucleicos são extremamente valiosos para fins de investigação de contaminantes. Dentre as técnicas baseadas no sequenciamento de ácido desoxirribonucleico (DNA), o *Multilocus Sequence Typing* (MLST), permite uma avaliação da diversidade genética e perfil clonal dos isolados.

A análise de tipificação por MLST já se mostrou eficiente para estudos taxonômicos (ALIKHAN et al., 2018) e investigações epidemiológicas de diversos patógenos bacterianos (COSTA et al., 2021), incluindo *S. maltophilia* (RIZEK et al., 2018; BRAGA et al., 2020). Essa técnica baseia-se no sequenciamento de genes housekeeping, no qual a variação alélica de cada *locus* é catalogada e uma sequência é atribuída ao perfil formado pelo conjunto de alelos, permitindo a identificação das cepas através dos tipos sequenciais (ST) (PAGE et al., 2017). O banco de dados do MLST de *S. maltophilia* foi desenvolvido em 2009 por Daniel Jonas da Universidade de Freiburg, Alemanha, e descrito por Kaiser et al. (2009) utilizando a análise de sete genes *housekeeping atpD, gapA, guaA, mutM, nuoD, ppsA* e *recA*.

Tendo em vista a emergência de cepas multirresistentes de *S. maltophilia* e um aumento de casos devido a pandemia causada pelo COVID-19, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética e o perfil epidemiológico de cepas de *S. maltophilia* caracterizadas por MLST, com foco nos ST já identificados no Brasil.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram incluídas no estudo 974 cepas de *S. maltophilia*, isoladas no período de 1958 a 2021, caracterizadas por MLST e depositadas no banco de dados de MLST para *S. maltophilia* desenvolvido por Kaiser et al. (2009) e curado por Daniel Jonas e Sabine Weber (<https://pubmlst.org/organisms/stenotrophomonas-maltophilia>). Os dados disponíveis foram analisados *in silico* e os metadados disponíveis coletados incluíram ST, continente, país, ano de isolamento, fonte, e associação com infecções em humanos (último acesso 01/07/2021).

2.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Uma árvore *neighbor-joining* baseada no alinhamento múltiplo das sequências concatenadas dos sete genes *housekeeping* (*atpD*, *gapA*, *guaA*, *mutM*, *nuoD*, *ppsA* e *recA*) totalizando 3.591 pb, foi construída com as cepas que possuíam o esquema completo de MLST (n = 972) utilizando a *Interactive tree of life* (iTOL) v3 (LETUNIC; BORK, 2016). Os perfis de MLST também foram analisados com o *GrapeTree* (ZHOU et al., 2018) utilizando o coeficiente de categorização e visualização com a ferramenta *minimum spanning tree* (MST). Os perfis também foram analisados utilizando o algoritmo eBURST para determinação de grupos (FEIL et al., 2004), sendo identificadas variantes de *locus* únicos (SLV) e variantes de duplo *locus* (DLV).

2.3 ANÁLISE DE DADOS

O índice de Simpson (HUNTER; GASTON, 1988) foi aplicado para mensurar o poder de resolução da técnica do MLST na diferenciação de cepas de *S. maltophilia*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 995 cepas disponíveis no banco de dados, 974 (97,9%) pertenciam a espécie *S. maltophilia*. Deste total, 972 (99,8%) apresentavam o esquema completo de MLST. A maioria das cepas (47,1%) foi isolada na Ásia, principalmente na Tailândia e na China, seguido da Europa (25,0%) e da América do Norte (20,7%). O Brasil é o único país depositante da América do Sul, com apenas dez (1,0%) cepas (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas de *S. maltophilia* (n = 974) depositadas no PubMLST *Stenotrophomonas maltophilia*.

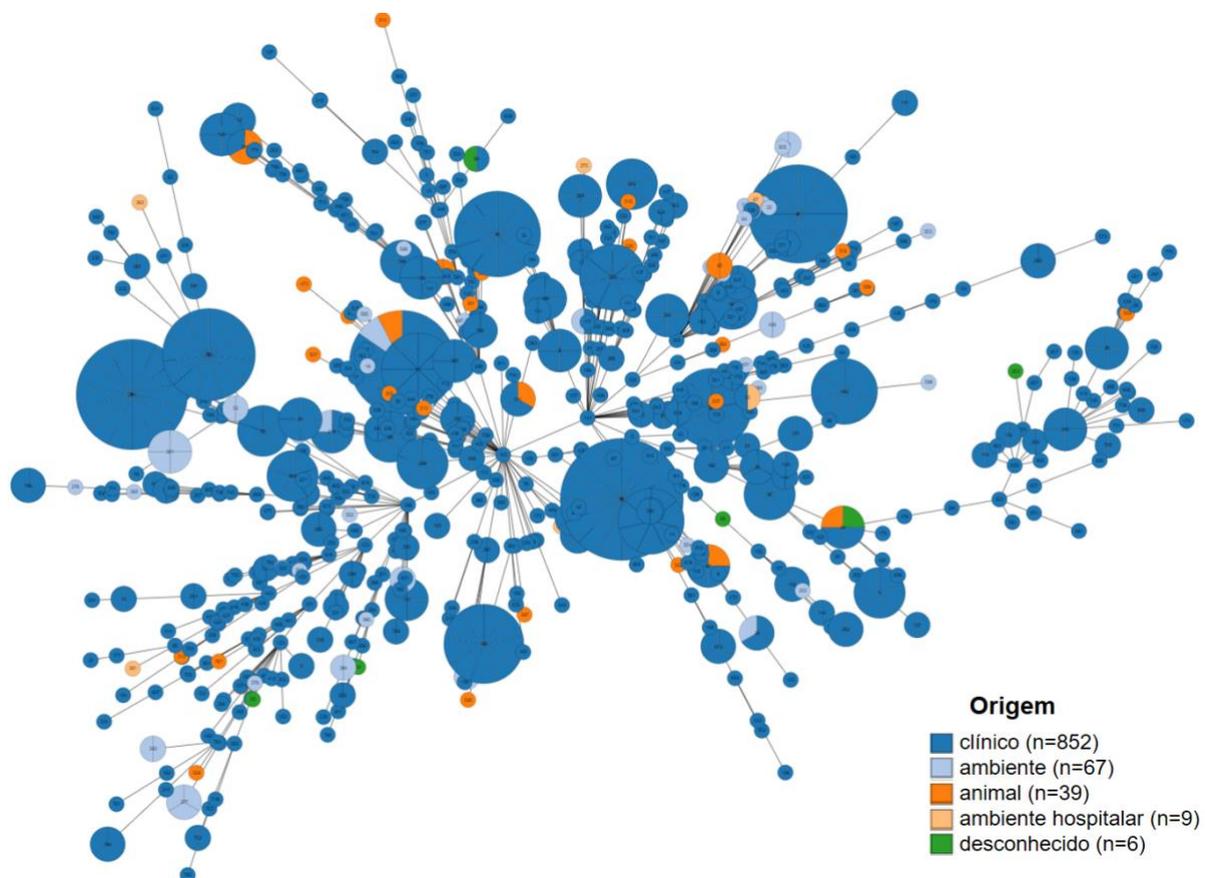
Continentes (n.º de cepas)	País (n.º de cepas)	Origem (n.º de cepas)
Ásia (459)	Tailândia (200), China (197), Japão (29), Coreia do Sul (25), Índia (5), Líbano (3)	Clínica (396), animal (35), ambiental (24), desconhecida (4)
Europa (244)	Alemanha (60), Itália (33), Espanha (26), França (22), Reino Unido (22), Bélgica (21) Escócia (21), Sérvia (11), Países Baixos (10), Eslovênia (7), Áustria (5), Polônia (3), Suécia (3)	Clínica (198), ambiental (43), animal (2), desconhecida (1)
América do Norte (202)	Estados Unidos da América (191), México (11)	Clínica (199), ambiental (3)
Oceania (51)	Austrália (51)	Clínica (46), ambiental (5)
América do Sul (10)	Brasil (10)	Clínica (7), animal (2), ambiental (1)
África (7)	Ilha da Reunião (4), Tunísia (3)	Clínica (7)
Desconhecido (1)	Desconhecido (1)	Desconhecida (1)

Fonte: (<https://pubmlst.org/organisms/stenotrophomonas-maltophilia>, último acesso: 01/07/2021).

A distribuição dos ST de acordo com a origem de isolamento utilizando o MST está apresentada na Figura 1. A maioria das cepas em todos os países depositantes foi de origem clínica, totalizando 853 cepas, o que representa 87,6% do total. As 972 cepas que possuíam o esquema de MLST completo foram identificadas em 679 ST distintos, uma taxa de ~1,4 cepa/ST. Esta diversidade genética também foi evidenciada na análise filogenética utilizando a

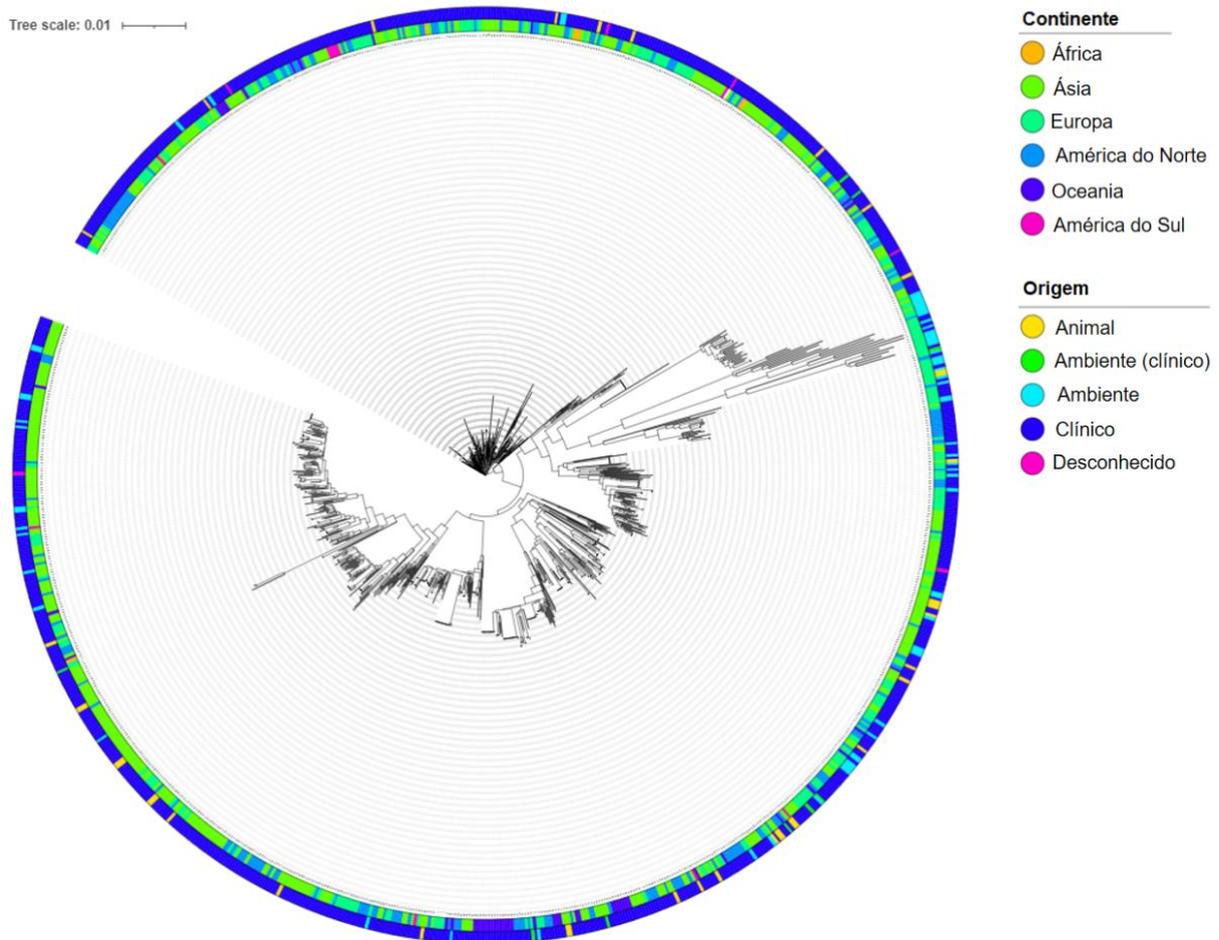
árvore *Neighbor-joining* (Figura 2). Em ambas as abordagens, esta diversidade foi evidenciada independente da origem de isolamento. Das 853 cepas de origem clínica, 851 apresentavam o esquema de MLST completo, e foram identificadas em 586 ST distintos, uma taxa de ~1,4 ST/cepa. Das cepas oriundas de outras origens, a diversidade genética identificada foi um pouco maior. As 39 cepas de origem animal foram classificadas em 36 ST distintos e as 76 cepas isoladas de amostras ambientais (incluindo as de ambientes hospitalares) foram identificadas em 64 ST, correspondendo a uma taxa de ~1,1 e ~1,2 cepa/ST, respectivamente.

Figura 1. *Minimum spanning tree* apresentando as relações genéticas entre as 974 cepas *S. maltophilia* (n=974) depositadas no PubMLST *Stenotrophomonas maltophilia*.



Fonte: (<https://pubmlst.org/organisms/stenotrophomonas-maltophilia>, último acesso: 01/07/2021). As cepas estão distribuídas de acordo com o Tipo Sequencial (ST). O tamanho do círculo é proporcional ao número de cepas. Linhas conectando os grupos ST, indicam que eles diferem em um alelo (linha sólida espessa), ou três a cinco *locus* (linhas finas e pontilhadas).

Figura 2. Árvore filogenética *Neighbor-joining* baseada nos sete genes *housekeeping* concatenados (totalizando 3.591 pares de base) das 972 cepas de *S. maltophilia* depositadas no PubMLST *Stenotrophomonas maltophilia*.



Fonte: (<https://pubmlst.org/organisms/stenotrophomonas-maltophilia>, último acesso: 01/07/2021) gerada no iTOL v3. O primeiro círculo interno representa os continentes, e o segundo círculo representa a origem do isolamento de cada cepa.

O Índice de Simpson calculado foi de 0,99. Este índice é utilizado para medir a diversidade genética entre os isolados, uma vez que calcula a probabilidade de cepas não relacionadas serem classificadas em diferentes grupos (HUNTER; GASTON, 1988). O nível aceitável de discriminação dependerá de vários fatores, mas um índice maior que 0,90 parece ser desejável para um esquema de tipificação (HUNTER; GASTON, 1988). Desta forma, os resultados indicam que o MLST é uma técnica eficiente para tipificação de cepas de *S. maltophilia*.

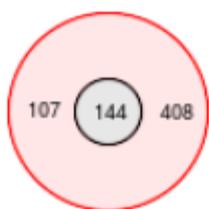
A alta diversidade também foi identificada utilizando o algoritmo do eBURST. Dos 679 ST descritos no banco de dados, 533 cepas de 346 ST formaram 91 grupos (Grupo 1-91) com complexos clonais (CC), com SLV e/ou DLV que compartilhavam cinco ou mais alelos em comum; e 333 ST (n = 439 cepas) foram identificados como *singletons*. Estes resultados demonstram que as cepas desta espécie possuem uma alta diversidade genética, uma vez que aproximadamente metade (45,2%) das cepas não formou CC.

As dez cepas isoladas no Brasil foram oriundas das regiões Sudeste e Nordeste, sendo classificadas em sete ST distintos e únicos no banco de dados: ST144 (n = 1), ST172 (n = 1), ST173 (n = 1), ST264 (n = 4), ST473 (n = 1), ST474 (n = 1), e ST552 (n = 1). Quatro ST (ST144, ST172, ST173 e ST264) foram isolados de infecções em humanos que ocorreram nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro no período de 2009 a 2014, e são únicos no banco de dados (RIZEK et al., 2018; BRAGA et al., 2020). Os ST473 e ST474 foram isolados em 2018 a partir de *swab* de cloaca de aves selvagens (PubMLST, 2021a,b). O ST552 foi isolado a partir de uma amostra de esterco bovino em 2012 (SILVA, 2019).

O ST144 foi o único que formou CC com as cepas disponíveis no banco, sendo pertencente ao Grupo 31 (Figura 3). Os demais seis ST não formaram grupos e foram identificados como *singletons*.

Figura 3. Grupo 31 resultante da análise com algoritmo eBURST de 972 cepas de *S. maltophilia* depositadas no banco de dados de MLST para *Stenotrophomonas maltophilia*

ST	Frequência	SLV	DLV
107	1	1	1
144*	1	2	0
408	1	1	1



Fonte: (<https://pubmlst.org/organisms/stenotrophomonas-maltophilia>, último acesso: 01/07/2021). ST- Tipo sequencial; SLV – variante de *locus* único; DLV – variante de duplo *locus*. O “*” sinaliza o ST dominante do complexo.

O ST144 foi o dominante do Grupo 31, sendo um SLV dos demais ST (ST107 e ST408) (Figura 2), ambos isolados de amostras clínicas na Coreia do Sul e na China, respectivamente

(RIZEK et al., 2018). O ST264 foi o mais prevalente no Brasil e foi isolado de amostra de escarro de um único paciente pediátrico não-hospitalizado com fibrose cística no Rio de Janeiro. As três cepas identificadas neste ST apresentaram genes associados a resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e betalactamases, além de genes associados à virulência, como genes relacionados a enzimas extracelulares, adesão, formação de biofilme, entre outros (BRAGA et al., 2020).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, cepas de *S. maltophilia* apresentaram alta diversidade genética quando caracterizadas por MLST, que apresentou alto poder discriminatório para tipificação de cepas desta espécie. O número de depósito entre os países ainda é muito distinto, e deve ser encorajada a tipificação destas cepas, principalmente as de origem clínica, de forma a facilitar a identificação de clones mais patogênicos para que medidas preventivas e de controle possam ser agilizadas em investigações epidemiológicas. No Brasil esta técnica já foi aplicada na identificação de cepas de origem clínica, mas com um número ainda muito reduzido (n=10). Como os ST identificados nestas cepas ainda são únicos no banco de dados, novos estudos são necessários para se identificar os principais clones circulantes no Brasil.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz do qual R. Lage é aluna de Mestrado Acadêmico.

REFERÊNCIAS

ADEGOKE, A.; STENSTROM, T. A.; OKOH, A. I. *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. **Front Microbiol**, v. 8, p.2276, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). Gerência de Investigações e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (Gipea)/Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES). **Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes**, p. 21, 2017.

ALIKHAN, N. F.; ZHEMIN, Z.; SERGEANT, M. J.; ACHTMAN, M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 4, p. e1007261, 2018.

ANDRADE, L. O. Métodos rápidos para identificação microbiana aplicados ao monitoramento ambiental de salas limpas: ênfase na tecnologia MALDI-TOF. 2017. 143 f. **Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BAIOU, A. et al. Clinical characteristics and risk factors for the isolation of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria from critically ill patients with COVID-19. **The Journal of Hospital Infection**, v. 110, p 165-171, 2021.

BIOMÉRIEUX. Disponível em: <biomerieux.com.br/produto/vitekr-2>. Acesso em: 30 de jun. 2021.

BRAGA, F. S. et al. Genomic information on *Stenotrophomonas maltophilia* ST264 isolated from a cystic fibrosis pediatric patient in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 1125-1127, 2020.

COSTA, L. V. Avaliação da diversidade microbiana presente em sistemas gerador de água purificada dedicada à produção de penicilínicos em Farmanguinhos. Fiocruz, 2014. 88f. **Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica)**, Rio de Janeiro, 2014.

COSTA, P. V. et al. Diversity of *Cronobacter* genus isolated between 1970 and 2019 on the American continent and genotyped using multi-locus sequence typing. **FEMS Microbiol Lett**, v. 368, n. 5, 2021.

CHANG, Y. T. et al. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. **Front Microbiol**, v. 6, n. 893, 2015.

CHONG, W. H. et al. State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. **Infection**, v. 11, p. 1–15. 11, 2021.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

FEIL, E. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol**, v. 86, p. 1518-1530, 2004.

GAUTAM, V. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging tool for unequivocal identification of non-fermenting Gram-negative bacilli. **The Indian journal of medical research**, v. 145, n. 5, p. 665–672, 2017.

HUNTER, P.; GASTON, M. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J Clin Microbiol**, v. 26, p. 2465–2466, 1988.

KAISER, S.; BIEHLER, K.; JONAS, D. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. **J Bacteriol**, v. 191, n. 9, p. 2934-2943, 2009.

LAGE, R. V. S.; COSTA, P. V.; COSTA, L. V.; VASCONCELLOS, L.; SILVA, S. V.; VILLAS-BOAS, M. H. S.; BRANDÃO, M. L. L. Diversidade de cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas entre 1958 e 2020 e genotipadas por *Multilocus sequence typing*. **R. Científica UBM - Barra Mansa (RJ)**, ano XXVI, v. 23, n. 45, 2. Sem. 2021 p. 129-141. ISSN 1516-4071

LAGE, R. V. et al. Phenotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* as a tracking tool for investigation in a pharmaceutical industry. Resumo (Anais). II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas, 2021.

LANGFORD, B. J. et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**, v. 26, n. 12, p. 1622-1629, 2020.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Res**, v. 44, p. 242-245, 2016.

LOONEN, A. J. M. et al. Comparative Study Using Phenotypic, Genotypic, and Proteomics Methods for Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. American Society for Microbiology. **J Clin Microbiol**, p. 1437-1439, 2012.

MIRZAEI, R. et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. **IUBMB life**, v.72, n. 10, p. 2097-2111, 2020.

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

MONTOYA, E. H. 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.

PAGE, A. J. et al. Comparison of classical multi-locus sequence typing software for next generation sequencing data. **Microb Genom**, v. 3, n. 8, 2017.

PubMLST. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Isolate information. Full information on isolate SM79 (id:637). 2021a Disponível em https://pubmlst.org/bigsdb?page=info&db=pubmlst_smaltophilia_isolates&id=637. Acesso em: 30 de jun. 2021.

PubMLST. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. *Stenotrophomonas maltophilia*. *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Isolate information. Full information on isolate SM115 (id:638). 2021b. Disponível em https://pubmlst.org/bigsdb?page=info&db=pubmlst_smaltophilia_isolates&id=638. Acesso em: 30 de jun. 2021.

RAVE, A. F. G., et al. Biochemical identification techniques and antibiotic susceptibility profile of lipolytic ambiental bacteria from effluents. **Braz J Biol**, v. 79, n. 4, p. 555-565, 2019.

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

LAGE, R. V. S.; COSTA, P. V.; COSTA, L. V.; VASCONCELLOS, L.; SILVA, S. V.; VILLAS-BOAS, M. H. S.; BRANDÃO, M. L. L. Diversidade de cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas entre 1958 e 2020 e genotipadas por *Multilocus sequence typing*. **R. Científica UBM** - Barra Mansa (RJ), ano XXVI, v. 23, n. 45, 2. Sem. 2021 p. 129-141. ISSN 1516-4071

SILVA, F. P. Análises genômicas de três isolados do gênero *Stenotrophomonas* oriundos de vermicomposto. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2019.

SOSTARICH, A. M. et al. Impact of multiresistance of gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. **Infection**; v. 36, n.1, p. 31- 35, 2008.

TRIFONOVA, A.; STRATEVA, T. *Stenotrophomonas maltophilia* - a low-grade pathogen with numerous virulence factors. **Infectious diseases**, v. 51. n. 3, p. 168-178, 2019.

VASCONCELOS, L. et al. Phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* as a tracking tool for investigation in a pharmaceutical industry. Resumo (Anais). **V International Symposium on Immunobiologicals**, p, 48, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. **Drug resistance**. Disponível em: <https://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/> Acesso em: 18 de janeiro de 2021.

ZHOU, Z. et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. **Genome Research**, v. 28, p. 1395-1304, 2018.